

SÉRIE A, N° 589

N° D'ORDRE

1320

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. EDOUARD POZERSKI

Docteur en médecine,
Licencié ès sciences naturelles,
Préparateur de physiologie à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA
PAPAÏNE. (ÉTUDE D'UN PHÉNOMÈNE DE DIGESTION
BRUSQUE. — IMMUNISATION DES ANIMAUX.)

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 22 décembre 1908, devant la Commission d'examen.

**MM. DASTRE,
HAUG,
MOLLIARD,**

président.

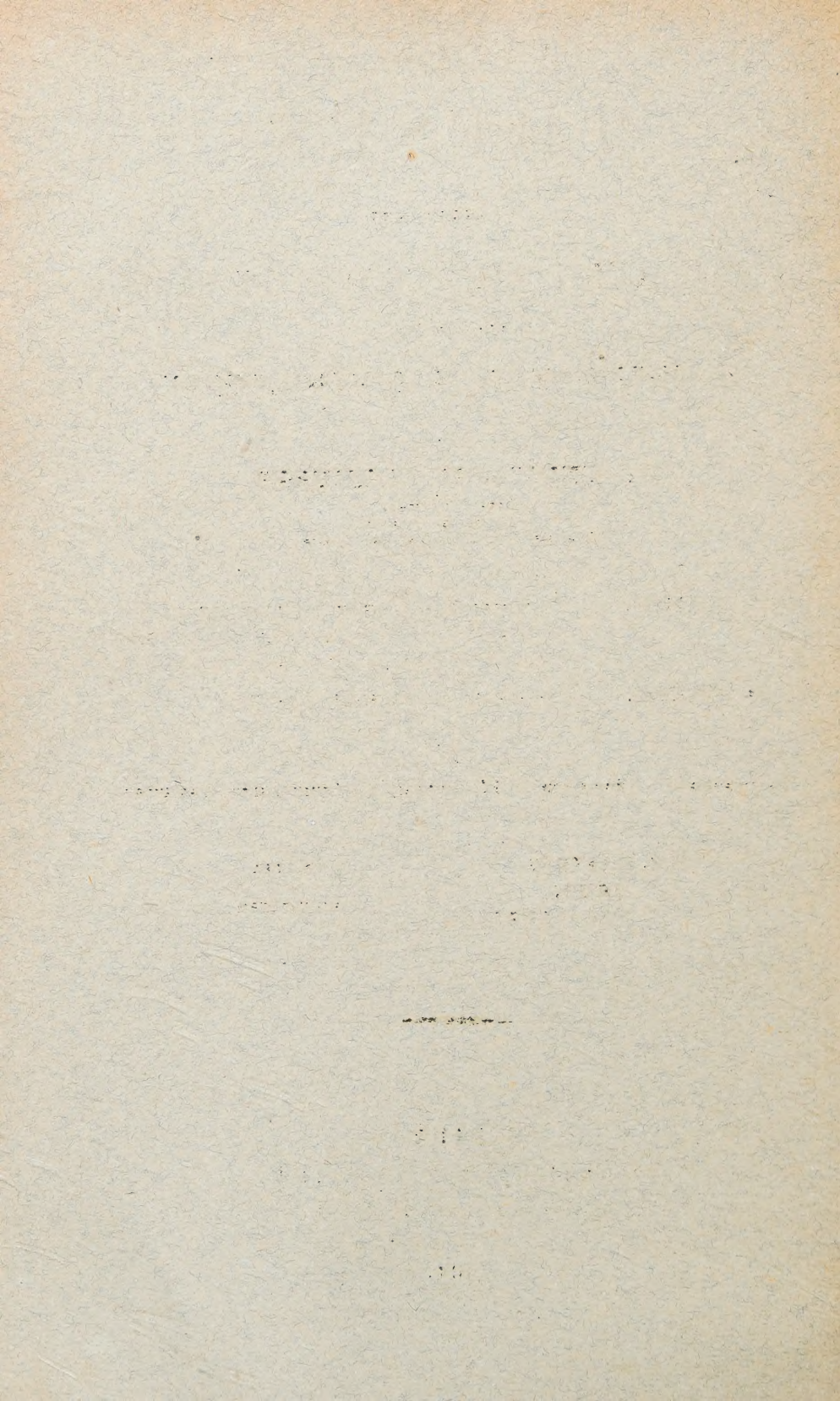
} examinateurs

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1908



THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

M M.

Doyen..... P. APPELL, *Professeur* Mécanique rationnelle.
Doyen honoraire.. G. DARBOUX, — Géométrie supérieure.

Professeurs
honoraire.

{ L. TROOST.
Ch. WOLF.
J. RIBAN.

Professeurs

LIPPMANN Physique.
BOUTY..... Physique.
BOUSSINESQ..... Physique mathém. et calcul des probabilités.
PICARD..... Analyse supérieure et algèbre supérieure.
H. POINCARÉ..... Astronomie mathém. et mécanique céleste.
Y. DELAGE..... Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
G. BONNIER..... Botanique.
DASTRE..... Physiologie.
KÖNIGS..... Mécanique physique et expérimentale.
VÉLAIN..... Géographie physique.
GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
CHATIN..... Histologie.
PELLAT..... Physique.
HALLER..... Chimie organique.
JOANNIS..... Chimie (Enseignement P. C. N.).
JANET..... Physique — —
WALLERAND..... Minéralogie.
ANDOYER..... Astronomie physique.
PAINLEVÉ..... Mathématiques générales.
HAUG..... Géologie.
TANNERY..... Calcul différentiel et calcul intégral.
RAFFY..... Application de l'analyse à la géométrie.
HOUSSAY..... Zoologie.
H. LE CHATELIER.. Chimie.
G. BERTRAND..... Chimie biologique.
N..... Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
M^{me} CURIE..... Physique générale.
N..... Chimie.
N..... Zoologie, évolution des êtres organisés.
POISEUX..... Mécanique et astronomie.
I. EDUC..... Physique.
HADAMARD..... Calcul différentiel et calcul intégral.
MICHEL..... Minéralogie.
BOUVEAULT..... Chimie organique.
BOREL..... Théorie des fonctions.
G. PRUVOT..... Anatomie comparée.
CAULLERY..... Zoologie.

Professeurs-
adjoints.

Secrétaire

A. GUILLET.

SÉRIE A, N° 589

N° D'ORDRE

1320

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. EDOUARD POZERSKI

Docteur en médecine,
Licencié ès sciences naturelles,
Préparateur de physiologie à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA
PAPAÏNE. (ÉTUDE D'UN PHÉNOMÈNE DE DIGESTION
BRUSQUE. — IMMUNISATION DES ANIMAUX.)

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 22 décembre 1908, devant la Commission d'examen.



**MM. DASTRE,
HAUG,
MOLLIARD.**

président.

} examinateurs

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1908



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

La propriété digestive du latex de l'arbre à melons (*Carica papaya*) sur les matières albuminoïdes est connue et utilisée depuis fort longtemps.

Depuis les premières recherches expérimentales de Roy (1) (1874), Wittmack (2) (1878), Beckolt (3) (1879), Moncorvo (4) (1879), Wurtz et Bouchut (5) (1879-1880), Martin (6) (1884-1885), etc. qui établissaient que cette propriété est liée à l'existence d'un ferment soluble, la *papaïne* (7), de nombreux travaux ont été publiés sur la question. La plupart ont trait aux conditions de milieu les plus favorables à l'action du ferment ou à l'étude des produits formés : les auteurs se sont proposé le plus souvent de comparer, à l'un ou à l'autre point de vue, la papaïne aux ferments protéolytiques animaux les plus étudiés, la pepsine et la trypsine. Les résultats qu'ils ont obtenus ne sont pas toujours très concordants et il est souvent difficile de savoir exactement à quelle cause il faut attribuer les divergences. On a souvent négligé, entre autres choses, d'indiquer minutieusement la nature et surtout l'état des matières avec lesquelles on a opéré ou les procédés employés pour apprécier l'intensité de la digestion. Or, on sait que les circonstances même les plus légères en apparence peuvent modifier considérablement les actions diastasiques.

L'étude du phénomène qui fera l'objet de la première partie de ce travail montrera, en particulier, combien les actions diastasiques sont parfois différentes les unes des autres et à quelles conclusions erronées on serait conduit en prétendant étudier

(1) ROY, *Glasgow Med. Journ.*, 1874.

(2) WITTMACK, *Bericht. Gesell. naturforsch. Freunde Berlin*, 1878, p. 40.

(3) BECKOLT, *Zeitsch. der allg. osterr. Apot. Verein*, t. XVIII, p. 361 et *Pharm. Journ.*, 3^e série, t. X, p. 343.

(4) MONCORVO, *Journal de Thérapie*, t. VII, p. 6, 1880.

(5) WURTZ et BOUCHUT, *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. LXXXIX, p. 425 (1879). WURTZ, *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. XC, p. 16379 et p. 787, 1880.

(6) MARTIN, *Journ. of Physiology*, t. V, p. 213, 1884 et même journal, t. VI, p. 336, 1885.

(7) Rappelons que le nom de *papaïne* a été donné à ce ferment par Wurtz. Antérieurement, Beckolt avait employé pour le désigner le nom de *papayotine* encore en usage aujourd'hui, surtout en Allemagne. Moncorvo, de son côté, l'avait appelé *cari-cine*.

certaines d'entre elles dans les circonstances qui ont paru convenables pour l'étude de certaines autres.

Nous n'avons pas à faire ici l'historique des recherches extrêmement nombreuses auxquelles la papaïne a donné lieu. Nous ne retiendrons des études antérieures aux nôtres que quelques points qui paraissent en rapport avec les faits exposés dans ce travail.

Une première donnée intéressante à notre point de vue ressort des expériences relatives à la détermination des températures mortelles pour le ferment : la papaïne est plus résistante à l'action de la température que la pepsine ou la trypsine. Harlay (1) qui a comparé à cet égard les trois ferments protéolytiques conclut que la papaïne, chauffée en solution aqueuse, commence à s'atténuer à partir de 75°, mais qu'il faut atteindre la température de 82°-83°, maintenue pendant une demi-heure, pour supprimer complètement son action protéolytique. Portée pendant le même temps à 60°, la pepsine subit déjà un affaiblissement marqué et le chauffage d'une demi-heure vers 68° la détruit presque complètement. Quant à la trypsine, elle serait, d'après le même auteur, moins résistante encore puisqu'il suffirait de porter le ferment pendant 30 minutes à 60° pour obtenir la disparition presque complète du pouvoir digestif. Ces chiffres n'ont évidemment qu'une valeur relative, car les résultats obtenus doivent varier plus ou moins avec les préparations de ferments, la dilution, la durée du chauffage, etc. Il n'en est pas moins incontestable que des trois ferments protéolytiques envisagés, la papaïne est celui qui paraît de beaucoup le moins sensible à l'action de la chaleur.

À la notion de température mortelle des ferments solubles se rattache naturellement, lorsqu'on étudie leur action, celle de température *optimum* et celle de températures *limites*. On sait que les diastases présentent en général leur maximum d'activité à une température assez voisine de la température mortelle. On était donc en droit de supposer que l'*optimum* de la papaïne se plaçait à un niveau sensiblement plus élevé que celui de la pepsine ou de la trypsine, par exemple. En fait, il ne semble pas que des recherches très nombreuses aient été entreprises sur cette

(1) HARLAY, *Thèse de l'Université de Paris (Pharmacie)* 1900 et *Journ. de Pharm. et de Chim.*, t. XI, 1900.

question. L'opinion classique, celle que l'on trouve exprimée dans l'ouvrage de Green (1), par exemple, est que : « The optimum temperature for papain is 35°-40° C » (Martin), ou encore que « The optimum temperature for the working of papain is 40° C » (Rideal). En nous reportant aux publications de Martin (2) nous n'avons pas trouvé qu'il fût fait mention d'expériences réalisées à des températures supérieures à 40°. Voulant contrôler une assertion de Rosbach (3) qui affirmait que la papaine digère aussi bien à la température du laboratoire qu'à celle de l'étuve, Martin s'est borné à comparer l'activité du ferment à basse température (15°) et à 40°. Les résultats de ses expériences l'ont conduit à cette conclusion que, quoique la papaine ne soit pas absolument sans effet sur la fibrine à 15°, elle se montre beaucoup plus active lorsqu'on opère au voisinage de 40°.

Rideal (4) a étudié systématiquement l'action de la papaine sur l'ovalbumine coagulée en opérant à des températures variant entre 28° et 48°. Il conclut de ses expériences que le pouvoir digestif du ferment croît progressivement jusque 40°, mais que son activité diminue rapidement aux températures plus élevées. Il remarque à ce propos que : « It is interesting to note that the temperature at which the digestive action is most pronounced is approximatively the temperature of the blood. » Il ajoute : « This is a remarkable fact, and a coincidence which it is difficult to explain. »

Une donnée assez précise qui se dégage des recherches de Martin, mentionnées plus haut, est que la température de 15° ne doit pas être éloignée de la limite inférieure à laquelle le ferment commence à manifester son action. Pour ce qui a trait à la détermination des limites supérieures, nous n'avons aucun renseignement précis. Une observation isolée, due à Wittmack (5), montrerait cependant que la papaine peut encore exercer son pouvoir digestif à 60°-65°, ce qui, d'après cet auteur, distinguerait le ferment du *Carica* de la pepsine.

Il y a lieu de faire remarquer immédiatement que la plupart des études relatives à la papaine ont été faites en

(1) J.-R. GREEN, *The soluble ferments and fermentation*. Cambridge, 1899.

(2) MARTIN, *Loc. cit.*

(3) ROSBACH, *Z. f. klin. Med.*, 1883, p. 527.

(4) RIDEAL, *Pharmac. Journ.*, 3^e série, t. XXV, 1894-95, p. 183.

(5) WITTMACK, *Communication à la Société d'histoire naturelle de Berlin* (1878), citée d'après Dujardin-Beaumetz et Egasse. *Les plantes médicinales*, Paris, 1889.

s'adressant à la fibrine ou à l'ovalbumine coagulée. Or, comme on le verra d'une façon saisissante au cours de ce travail, la nature et surtout l'état de la matière à digérer constituent, au moins pour la papaïne, une condition capable de faire varier à un haut degré les limites et l'*optimum* de température. On eût vraisemblablement fait cette constatation si l'on avait tenté l'étude systématique de l'action de la papaïne sur les matières albuminoïdes prises à l'état naturel : sérum sanguin ou albumine d'œuf. Or, non seulement la littérature relative à la papaïne est muette sur ce point, mais nous ne possédons même aucun document sur la digestion des sérums naturels. Pour ce qui a trait à l'ovalbumine, on ne trouve que deux ou trois observations qui paraissent avoir été faites incidemment et qui seraient certainement restées dans l'oubli, si nos recherches n'avaient pas fourni, aux auteurs qui en ont tenté la vérification, l'occasion de les découvrir.

D'après Fr. Sachs (1), Wittmack (2) aurait signalé que l'albumine liquide additionnée de latex de *Carica* devient gélatineuse lorsqu'elle est portée à 58°-60°, se dissout ensuite complètement par chauffage prolongé et se transforme à 80° en un liquide laiteux qui présente les propriétés des peptones.

D'après le même auteur, Hirsch (3) a cru observer qu'après une digestion de quatre heures à 38° l'ovalbumine liquide était fortement digérée par la papaïne. Rehm (4) aurait constaté d'autre part, qu'après 7 heures d'étuve, 70 à 75 0/0 d'albumine d'œuf liquide pouvait être digérée par la papaïne. Il est important de noter ici que ces auteurs mesuraient la quantité d'albumine digérée en ayant recours à la coagulation par la chaleur, en milieu faiblement acétique. On verra, au cours de notre exposé, que la méthode de mesure qu'ils ont employée les a conduits, avec des observations d'ailleurs exactes, à des conclusions tout à fait erronées.

La première partie de ce travail est née précisément de recherches tentées dans le but de comparer l'action de la papaïne sur les albuminoïdes naturels et sur les albuminoïdes modifiés par

(1) FR. SACHS, *Zeitsch. f. physiolog. Chem.*, t. LI, 1907, p. 488.

(2) WITTMACK, 52 *Versamml. deutsch. Naturfors. u. Aerzte*, Baden-Baden, 1879. cité d'après Albrecht. *Corr. Bl. f. schweiz. Aerzte*, t. X, p. 684.

(3) HIRSCH, *Therap. Monatsh.*, 1894, p. 609.

(4) REHM, *Inaug. Dissert.*, Munich, 1903.

la coagulation. Les résultats inattendus des premières expériences qu'il paraissait d'abord difficile d'interpréter nous ont amené à reconnaître l'existence d'un phénomène diastatique, d'allure singulière, qui se caractérise par sa brusquerie, son intensité et surtout par les conditions de température où il se produit.

Faites pour la plupart en collaboration avec mon maître, M. C. Delezenne, et mon ami M. H. Mouton, les recherches qui font l'objet de cette première partie ont donné lieu à quelques notes préliminaires (1) dont les résultats fondamentaux ont été confirmés et développés sur quelques points par Jonescu (2) et Fr. Sachs (3):

La seconde partie de notre travail se rattache à la précédente par l'étude de l'action digestive de la papaine sur le sérum des animaux préparés par des injections répétées de ferment. Elle a spécialement trait à la recherche et à l'analyse de quelques réactions caractéristiques qui peuvent apparaître au cours des essais d'immunisation.

Très peu de résultats avaient été obtenus dans cette voie. Quelques auteurs avaient simplement signalé l'impossibilité d'immuniser les animaux de laboratoire contre l'action toxique des préparations de ferment. Tout en confirmant ces observations, nous avons pu noter certaines modifications subies par l'organisme pendant la préparation, en particulier la présence d'anticorps dans le sérum et l'hypersensibilité manifestée par certaines espèces. (4)

(1) DELEZENNE, MOUTON et POZERSKI, Sur l'allure anormale de quelques protéolyses produites par la papaine. *C. R. de la Soc. de Biologie*, t. LX, 1906, p. 68.

DELEZENNE, MOUTON et POZERSKI, Sur la digestion brusque de l'ovalbumine du sérum sanguin par la papaine. *C. R. Soc. de Biol.*, t. LX, 1906, p. 309.

MOUTON et POZERSKI, Liquéfaction instantanée du blanc d'œuf par la papaine à la température du laboratoire. *C. R. Soc. de Biol.*, t. LXIV, 1908, p. 86.

POZERSKI, Digestion rapide par la papaine à haute température, de quelques tissus animaux. *C. R. Soc. de Biol.*, t. LXIV, 1908, p. 1105.

(2) JONESCU, *Bioch., Zeitsch.*, t. II, 1906, p. 177.

(3) FR. SACHS, *Loc. cit.*

(4) POZERSKI, Anaphylaxie du cobaye à la papaine. *C. R. Soc. de Biol.* 1908, t. LXIV, n° 14, p. 631.

POZERSKI, Sur la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des lapins préparés contre la papaine. *C. R. Soc. de Biol.* 1908, t. LXIV, n° 18, p. 896.

PREMIÈRE PARTIE

Étude d'un phénomène de digestion brusque par la papaïne

CHAPITRE I

PREMIERS ESSAIS DE DIGESTION DE L'OVALBUMINE ET DU SÉRUM NATURELS PAR LA PAPAÏNE. LEURS RÉSULTATS.

On sait depuis longtemps que les matières albuminoïdes des tissus et des liquides de l'organisme présentent, à l'état naturel, une résistance remarquable à l'action de certains ferments protéolytiques, particulièrement la trypsine. Dans ses leçons de physiologie expérimentale, Claude Bernard signalait déjà que des fragments de tissus portés à l'état frais dans du suc pancréatique finissent par se putréfier sans avoir subi l'attaque du ferment, alors que les mêmes tissus soumis à une cuisson préalable se digèrent très rapidement. L'étude systématique de l'action de la trypsine sur les tissus et les liquides albuminoïdes conduisit plus tard à cette conclusion (Fermi) que non seulement l'albumine *naturelle*, c'est-à-dire telle qu'elle se présente dans les organismes vivants, offre à l'action de la trypsine une résistance maximum, mais qu'elle possède à un haut degré la propriété d'entraver l'action digestive du ferment sur les matières albuminoïdes qu'une *dénaturation* préalable a pu rendre faciles à attaquer. Fermi (1), Pugliese et Coggi (2), Hahn (3), Camus et Gley (4), Landsteiner (5), etc., ont étudié soigneusement ce phénomène qu'ils ont rapporté à l'action antagoniste d'un antiferment, l'antitrypsine qui existerait normalement dans les liquides albuminoïdes naturels, le sérum sanguin par exemple.

Que l'action empêchante de ces liquides soit due réellement à la présence d'un antiferment, qu'elle s'explique, comme on l'a

(1) FERMI, *Cent. f. physiol.*, 1894.

(2) PUGLIESE et COGGI, *Bollet. Scienc. med.*, 1897.

(3) HAHN, *Berlin Klin. Woch.*, 1897.

(4) CAMUS et GLEY, *Bullet. de la Soc. de Biolog.*, 1897.

(5) LANDSTEINER, *Centr. f. Bact.*, 1900.

soutenu plus récemment, par un simple phénomène d'adsorption entre colloïdes ou qu'elle relève d'une toute autre cause, il importe peu. Quel qu'en soit en effet le mécanisme, cette action nous apparaît comme un moyen employé par l'organisme pour protéger les éléments qui le constituent contre l'action nocive de ses propres ferments. Partant de ce point de vue, il était intéressant de se demander si les matières albuminoïdes animales se comportent de la même manière lorsqu'on les met en contact avec des ferments qui leur sont tout à fait étrangers, avec des ferments protéolytiques d'origine végétale, par exemple. C'est pour répondre à cette question que nous nous étions proposé d'étudier tout d'abord comparativement l'action digestive de la papaine sur des albuminoïdes naturels (sérum sanguin ou albumine d'œuf) et sur les mêmes substances préalablement coagulées par la chaleur.

L'expérience à réaliser se présentait, semble-t-il, d'une manière très simple. On devait maintenir à une température supposée convenable pour l'action du ferment, à 38-40° par exemple, un mélange de l'albuminoïde en expérience et d'une solution de papaine et mesurer après un certain temps la quantité de matière digérée. Pour faire cette mesure, il paraissait indiqué d'employer la technique ordinairement en usage pour apprécier la digestion des albuminoïdes, c'est-à-dire de porter à la température d'ébullition, en milieu acide, le mélange de digestion et d'évaluer la quantité de matière transformée, soit par la pesée du coagulum, soit par le dosage de l'azote dans le précipité ou le filtrat.

Nos premiers essais donnèrent d'emblée des résultats singuliers : Dans les mélanges de papaine et d'ovalbumine coagulée, la digestion, à peine marquée dans les deux ou trois premières heures d'étuve, subissait un accroissement régulier, de telle sorte que pour une dose convenable de ferment, la plus grande partie de la substance attaquable finissait par disparaître. Dans les mélanges d'ovalbumine liquide et de papaine, la digestion était souvent au contraire très considérable au début de l'expérience ; mais, chose curieuse, la quantité de matière transformée, loin de s'accroître, semblait se réduire progressivement, comme si l'on avait affaire à un véritable phénomène de rétrogradation. De cette marche en apparence inverse des deux phénomènes digestifs, il résultait évidemment que si l'on n'eût comparé que deux

échantillons, prélevés après deux ou trois heures d'étuve par exemple, on aurait été amené à conclure que la papaïne digère beaucoup plus aisément l'ovalbumine crue que l'albumine coagulée. Si, au contraire, la comparaison n'avait porté que sur deux échantillons, prélevés après 12 ou 24 heures de digestion, on serait arrivé non moins logiquement à la conclusion opposée, c'est-à-dire que l'albumine crue était infiniment moins attaquable par la papaïne que l'albumine coagulée.

Quelques expériences répétées dans les mêmes conditions que les précédentes, mais en substituant le sérum sanguin à l'albumine d'œuf, donnèrent des résultats identiques.

Cette allure tout à fait anormale du phénomène de digestion des matières albuminoïdes naturelles nous amenait à en étudier minutieusement la marche dans l'espoir d'arriver à en trouver une explication.

Sans s'arrêter tout d'abord à la régression apparente de la digestion que l'on avait observée lorsque le temps de contact s'était prolongé, on songea à regarder quelle serait la grandeur du phénomène lorsqu'on se rapprocherait de l'origine des temps et où se placerait le maximum de l'action dont on n'avait mis en évidence que la période décroissante. On répéta donc les mêmes expériences en ne laissant le ferment et l'albumine en contact que pendant une durée qui peut être considérée comme très courte, lorsqu'il s'agit de protéolyse d'une matière albuminoïde naturelle : un quart d'heure, une demi-heure, une heure par exemple. On observa que dans ces conditions la digestion de l'ovalbumine crue ou du sérum sanguin était plus considérable encore que dans les expériences précédentes et que le maximum se plaçait à nouveau dans l'échantillon qui avait séjourné le moins longtemps à l'étuve. Après une demi-heure, par exemple, la moitié, quelquefois même les deux tiers des substances coagulables échappaient à l'action de la chaleur. Pendant le même temps, la digestion de l'ovalbumine ou du sérum coagulés était généralement nulle ou presque nulle.

Il était légitime de supposer qu'un phénomène qui atteignait son maximum avec une telle rapidité à la température de l'étuve se ralentirait sensiblement si les mélanges étaient abandonnés à une température plus basse, à 20° par exemple. On espérait ainsi pouvoir suivre plus facilement encore la marche de la digestion dès l'origine de l'expérience et être à même d'en tracer

assez exactement la courbe. Or, une première expérience faite à la température du laboratoire (18°) nous montra qu'à l'inverse de ce que nous supposions l'albumine subissait en un espace de temps très court (30 minutes) une digestion au moins égale à celle que l'on avait constatée à 40°. On répéta donc l'expérience en ne laissant le ferment et l'albumine au contact que pendant quelques minutes; on s'efforça même de réduire le temps de contact préalable le plus possible en portant le mélange, aussitôt après l'addition de papaïne, à la température d'ébullition. On arriva à des résultats qui rappelaient exactement les précédents. Non seulement il y eut digestion très intense lorsque le mélange avait été chauffé aussitôt effectué, mais c'était encore là que le poids de matière coagulable était minimum. D'autre part, en amenant séparément l'ovalbumine ou le sérum et la solution de papaïne à la température de 0°, en les mélangeant à cette température et en portant brusquement les liquides de 0° à 100°, on n'observa après chauffage aucune diminution de la matière digérée.

Les expériences que nous rapportons ci-dessous ont été choisies dans le but de présenter en raccourci l'ensemble des faits que nous avons successivement observés dans cette première partie de nos recherches.

Exp. I. — Dans une série de flacons, on introduit 15 c. c. d'albumine d'œuf crue étendue au 1/3 dans l'eau salée physiologique. On ajoute à chacun d'eux 5 c. c. d'une solution de papaïne de Merck à 2 0/0 dans l'eau physiologique et on porte à l'étuve à 38°. Les mélanges sont successivement retirés de l'étuve au bout de 3, 5, 8, 12, et 16 heures. Ils sont alors additionnés de 2 gouttes d'acide acétique et portés directement à la température d'ébullition pour coaguler les matières albuminoïdes qui ont échappé à la digestion. Les précipités formés sont jetés sur des filtres tarés, lavés à l'eau bouillante, puis desséchés à l'étuve, à 110° jusqu'à constance de poids. Un échantillon témoin dans lequel on a ajouté aux 15 c. c. d'albumine diluée 5 c. c. de la solution de papaïne chauffée à 100° pendant 5 minutes est traité de la même façon. Le tableau suivant indique l'intensité de la digestion dans l'ensemble de la série.

TEMPS DE SÉJOUR à 38°	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin.....	420 milligr.	
3 heures.....	218 milligr.	202 milligr.
5 heures.....	240 milligr.	180 milligr.
8 heures.....	257 milligr.	163 milligr.
12 heures.....	272 milligr.	148 milligr.
16 heures.....	289 milligr.	131 milligr.

Exp. II. — On fait une série de mélanges contenant 15 c. c. d'albumine d'œuf diluée au 1/3, dans l'eau salée physiologique et 2 c. c. de la solution de papaine de Merck à 2 0/0. L'un d'eux est additionné aussitôt fait de 2 gouttes d'acide acétique et porté rapidement à 100°. Les autres sont abandonnés à la température du laboratoire (18°), pendant des temps variables, puis traités de la même façon que le précédent. Les précipités recueillis sur des filtres tarés sont soigneusement lavés et desséchés jusqu'à constance de poids.

TEMPS DE SÉJOUR à 18°.	POIDS des précipités.	QUANTITE d'albumine digérée.
Témoin	338 milligr.	
1 minute.	226 milligr.	412 milligr.
5 minutes	232 milligr.	106 milligr.
10 minutes	243 milligr.	95 milligr.
15 minutes	250 milligr.	88 milligr.
30 minutes	259 milligr.	79 milligr.
1 heure	283 milligr.	55 milligr.
2 heures	289 milligr.	49 milligr.
4 heures	297 milligr.	41 milligr.

EXP. III. — Solution de papaïne de Merck à 2 0/0 dans l'eau physiologique. Sérum de mouton étendu de 2 volumes d'eau physiologique.

Dans une série de flacons on distribue 15 c. c. de sérum dilué auxquels on ajoute 2 c. c. de la solution de papaïne. L'un des échantillons est additionné aussitôt après mélange de 2 gouttes d'acide acétique et porté immédiatement à 100°. Les autres échantillons sont maintenus à la température du laboratoire (18°) et soumis au même traitement 5, 10, 15, 30 minutes, etc., plus tard.

Après coagulation des matières albuminoïdes, les liquides sont jetés sur des filtres tarés, les précipités soigneusement lavés à l'eau acidulée, puis desséchés à 110° jusqu'à constance de poids.

On ajoute à la série un échantillon témoin contenant 15 c. c. de sérum dilué et 2 c. c. de papaïne, préalablement portée à 100° pendant 5 minutes.

TEMPS DE SÉJOUR à 18°.	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin	405 milligr.	
4 minute	481 milligr.	224 milligr.
5 minutes	482 milligr.	223 milligr.
10 minutes	498 milligr.	207 milligr.
15 minutes	216 milligr.	489 milligr.
30 minutes	230 milligr.	475 milligr.
1 heure	254 milligr.	451 milligr.
2 heures.....	263 milligr.	442 milligr.
4 heures.....	276 milligr.	429 milligr.

Exp. IV. — On introduit dans quatre flacons 15 c. c. de sérum de bœuf dilué au 1/3 et l'on porte chacun d'eux à des températures variables. L'un est placé à l'étuve à 40°, un autre est abandonné à la température du laboratoire (20°), le troisième est amené à 10°, le quatrième est refroidi à 0°. Quand l'équilibre de température est atteint, on ajoute à chacun des flacons 4 c. c. d'une solution de papayotine de Merck à 4 0/0 amenée elle-même préalablement aux diverses températures correspondantes.

Les mélanges additionnés de deux gouttes d'acide acétique sont portés aussitôt faits, et très rapidement, de la température initiale à la température d'ébullition. Les matières albuminoïdes coagulées sont recueillies sur des filtres tarés, les précipités lavés soigneusement, puis desséchés jusqu'à constance de poids.

TEMPÉRATURE INITIALE des mélanges.	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin.....	323 milligr.	»
40°.....	63 milligr.	260 milligr.
20°.....	62 milligr.	261 milligr.
10°.....	60 milligr.	262 milligr.
0°.....	64 milligr.	259 milligr.

Le phénomène curieux que nous venions d'observer était bien de nature diastasique, puisqu'en substituant à la solution de papaïne une solution de ferment portée au préalable à la température de 100°, on retrouvait dans la matière coagulable la totalité des albuminoïdes soumis à l'action du ferment. D'autre part, en évaluant dans les expériences extemporanées la quantité de matière transformée en fonction de la quantité de papaïne employée, on observait que la digestion suivait, au moins, dans de certaines limites, la loi de Schutz-Borissow : la quantité de matière transformée variait en effet d'une façon sensiblement proportionnelle à la racine carrée de la quantité de ferment ajoutée. C'est ce que paraît démontrer l'expérience suivante :

Exp. V. — A 15 c. c. de sérum de chien dilué au 1/3 dans l'eau salée physiologique, on ajoute des quantités variables de la solution de papaïne de Merck à 2 0/0. On amène tous les mélanges au même volume en complétant avec la solution physiologique.

Les divers mélanges additionnés de 2 gouttes d'acide acétique sont portés rapidement à la température d'ébullition. Les précipités sont recueillis sur des filtres tarés, lavés et desséchés jusqu'à constance de poids.

QUANTITÉ de papaine employée.	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin.....	350 milligr.	"
1 c. c.....	80 milligr.	270 milligr.
2 c. c.....	146 milligr.	204 milligr.
4 c. c.....	191 milligr.	159 milligr.
6 c. c.....	251 milligr.	99 milligr.
8 c. c.....	280 milligr.	79 milligr.

Le graphique ci-contre (fig. 1) dans lequel les quantités de ferment de l'expérience précédente ont été portées en abscisses et les quantités d'albumine digérée en ordonnées, donne, avec les points expérimentaux, la courbe calculée théoriquement d'après l'un de ces points (0,25-70). On voit que tous les points expérimentaux, sauf un, se placent au voisinage immédiat de la courbe théorique.

L'examen des filtrats nous montrait que la transformation presque instantanée de l'albumine, que nous venions d'observer, aboutissait à la formation de produits de digestion relativement avancés. Non seulement ces filtrats présentaient toutes les réactions caractéristiques des protéoses, mais après précipitation par le sulfate d'ammoniaque à saturation, ils donnaient encore une réaction du biuret très intense, preuve qu'il s'était formé dans le court espace de temps pendant lequel on avait opéré une quantité très appréciable de peptone.

Toutes ces expériences avaient été faites en utilisant des préparations commerciales de papaine fréquemment employées dans les recherches de laboratoire. Nous nous étions servi, en particulier, des produits fournis par la maison Merck sous le nom de papaine et de papayotine. Tous les deux nous avaient donné des résultats de même ordre quoique en général le degré de leur activité

se fût montré assez différent (1). Il était donc nécessaire, avant de poursuivre nos recherches sur cette question, de contrôler les premiers résultats obtenus en éprouvant l'action d'un latex de

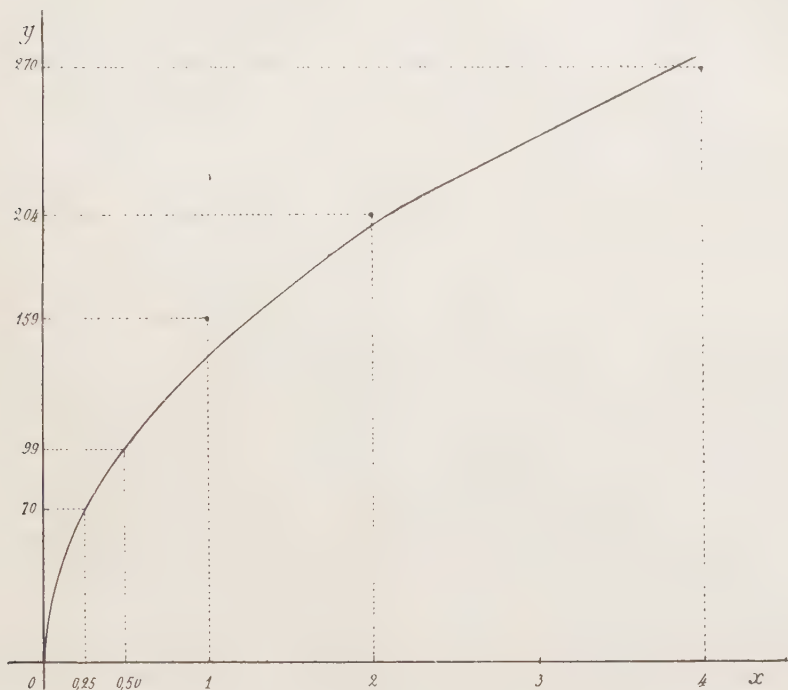


Fig. 1.

papayer recueilli par nous-même, dans des conditions qui excluaient toute cause d'erreur (impuretés, altération, etc.), capable de vicier les résultats. Grâce à l'obligeance de M. Guignard nous avons eu à notre disposition quelques spécimens de papayer (*Carica quercifolia*) sur lesquels nous avons pu prélever dans de bonnes conditions du latex qui a été mis à dessécher aussitôt et qui nous a servi ensuite pour quelques expériences de contrôle. Les résultats ont été tout à fait identiques à ceux que nous

(1) En général, les échantillons de papaine se sont montrés plus actifs que ceux de papayotène. Quelques-uns de ces derniers qui digéraient la fibrine avec une intensité à peu près égale à celle de la papaine n'agissaient que très faiblement sur le sérum ou l'albumine, au moins dans les conditions particulières de nos expériences : nous avons eu plus récemment des échantillons de papayotène qui nous ont fourni de très bons résultats.

avaient fournis les préparations commerciales de Merck. Le phénomène de digestion brusque constaté dans toutes ces expériences est donc bien produit par la papaïne. A défaut d'autres indications, ce sont les produits de Merck qui seront désignés au cours du travail sous les noms de papaïne et de papayotine.

Laissant de côté pour un instant l'apparence paradoxale d'une digestion dont l'intensité décroît lorsque croît le temps de contact entre le ferment et la matière à digérer, nous nous trouvons tout d'abord en présence du phénomène tout aussi singulier d'une digestion véritable, instantanément produite par l'action d'un ferment.

Non moins que la brusquerie de cette action, son indifférence vis-à-vis des températures auxquelles elle paraissait se produire semblait devoir tout d'abord l'écarter des réactions diastasiques ordinaires. Mais, étant donné la rapidité qu'on était obligé de lui supposer si l'on admettait qu'elle s'accomplissait pendant le temps parfois très court où les matières étaient mélangées, on était inévitablement amené à se demander si la période toujours très courte également (de l'ordre de la minute) pendant laquelle on élève la température du mélange pour le porter à l'ébullition n'intervient pas, et peut-être d'une manière prépondérante ou même exclusive.

Quelques-unes des observations antérieures paraissaient particulièrement favorables à cette dernière hypothèse : si la digestion s'accomplissait pendant la courte période pendant laquelle le mélange s'élève rapidement vers la température de l'ébullition, on comprenait facilement qu'il fût indifférent de partir d'un mélange à 0° ou à 20°-40°. D'autre part, la diminution observée dans l'intensité de la digestion lorsque le temps de contact aux températures peu élevées allait en croissant, trouvait dans cette nouvelle hypothèse une explication naturelle. Au lieu d'une régression de la digestion, difficile à accepter, on pouvait supposer qu'à ces températures il se produit seulement une atténuation progressive du ferment en présence de la matière à digérer. L'hypothèse que nous venons d'admettre provisoirement, nous avons cherché à l'appuyer sur des preuves directes que nous allons exposer maintenant.

CHAPITRE II

ABSENCE DU PHÉNOMÈNE DE DIGESTION BRUSQUE AUX TEMPÉRATURES ORDINAIRES

Supposer que le phénomène de digestion brusque que nous avons observé n'avait pas lieu aux températures ordinaires, mais se produisait pendant le chauffage, c'était mettre en doute, dans le cas qui nous occupe, la validité du seul procédé classique employé tout à la fois pour arrêter la digestion et pour séparer les albuminoïdes de leurs produits de transformation. On se mettait par là dans la nécessité de trouver un moyen nouveau qui, sans modifier la température, permette d'arrêter définitivement l'action du ferment ou de séparer complètement les albumines des produits de la digestion. Faute d'un procédé permettant d'obtenir rigoureusement l'un ou l'autre de ces résultats, on pouvait tout au moins donner à l'hypothèse adoptée un certain degré de vraisemblance, si au moyen de procédés de séparations partielles on obtenait les mêmes résultats en présence ou en l'absence du ferment actif.

Précipitation par les sels. — L'action précipitante de certains sels, communément employés pour effectuer la séparation partielle des différents produits de digestion, ne pouvait nous donner que très imparfaitement la solution recherchée. La précipitation par le sulfate de zinc ou le sulfate d'ammoniaque à saturation pouvait cependant nous fournir une donnée précise. La peptone, dont nous avons toujours constaté l'existence dans les filtrats des liquides soumis à la coagulation par la chaleur, apparaissait-elle dès les températures ordinaires ?

L'expérience suivante montre que le sulfate d'ammoniaque dissous à saturation dans nos liquides légèrement acidulés, précipite avec la même intensité les mélanges additionnés de papaine active et les mélanges témoins où la papaine a été remplacée par une dose égale de ferment préalablement bouilli.

D'autre part, les liquides séparés du précipité par filtration

ne donnent nullement la réaction du biuret, alors que celle-ci est toujours très intense dans les filtrats des mélanges précipités par le même agent, après action de la chaleur.

Exp. VI. — On fait les 3 mélanges suivants :

- a) Albumine d'œuf diluée de moitié 15 c. c. + Solution de papaïne 5 c. c.
- b) Albumine d'œuf diluée de moitié 15 c. c. + Solution de papaïne 5 c. c.
- c) Albumine d'œuf diluée de moitié 15 c. c. + Solution de papaïne à 20/0 bouillie 5 minutes 5 c. c.

Les 3 mélanges sont maintenus 10 minutes à la température du laboratoire.

Au bout de ce temps, a) est porté à l'ébullition, refroidi et additionné de SO_4Zn à saturation, b) et c) sont au contraire additionnés d'emblée de SO_4Zn à saturation.

Dans les 3 précipités soigneusement recueillis, on dose l'azote total par la méthode de Kjeldahl. On obtient les résultats suivants :

Azote de a)	68 mgr
— de b)	93 mgr 24
— de c)	92 mgr 40

Le filtrat de a) donnait une réaction du biuret très intense même après avoir été fortement dilué. Les filtrats de b) et c) ne donnaient au contraire que la légère coloration bleue violacée due à la petite quantité d'albumine qui avait échappé à la coagulation et aux albuminoïdes de la solution de papaïne.

Il ne se forme donc pas de peptone vraie à la température ordinaire. C'est d'ailleurs le seul renseignement précis que pouvait nous fournir l'emploi de ces agents. A des concentrations plus faibles, en effet, les mêmes sels ne précipitent plus les albumoses que partiellement et ils laissent, d'autre part, une portion plus ou moins importante de l'albumine en solution.

Pour des raisons du même ordre, l'emploi du sulfate de magnésie ou du chlorure de sodium dissous à saturation ne pouvait guère nous fournir de renseignements exacts sur la présence d'albumoses dans nos liquides, puisque diverses fractions de ces substances précipitent sous l'influence de ces deux sels en même temps que les globulines, alors que d'autres échappent totalement à la précipitation et se retrouvent dans les filtrats avec l'albumine. Nous mentionnerons toutefois que le sulfate de magnésie dissous à saturation dans le sérum ou l'ovalbumine donne des précipités de même poids et d'égale richesse en azote, qu'il s'agisse des mélanges additionnés de papaïne ou des mélanges témoins. Ce résultat se produirait difficilement, semble-t-il, si

Les matières albuminoïdes avaient été plus ou moins modifiées par la digestion.

Précipitation par l'alcool. — Des expériences antérieures, faites dans le but de caractériser les produits de digestion obtenus après coagulation par la chaleur, nous avaient montré que les produits de transformation qui passent dans les filtrats sont totalement ou presque totalement solubles dans l'alcool à 75°. En dehors de la peptone, ces produits sont presque exclusivement constitués par des albumoses secondaires. Cette donnée nous permettait de rechercher si les mêmes produits se forment dans l'ovalbumine ou le sérum additionnés de papaïne et conservés un temps variable à la température du laboratoire. En amenant les mélanges de digestion, soit aussitôt après qu'ils avaient été effectués, soit même après quelques heures à un titre alcoolique d'environ 70°-75°, nous avons pu nous assurer qu'ils donnaient des précipités de poids sensiblement égal à ceux des mélanges témoins traités par l'alcool dans les mêmes conditions. C'est ce que nous montrent très nettement les deux expériences ci-dessous.

EXP. VII. — A deux mélanges contenant 10 c. c. d'albumine d'œuf diluée de moitié on ajoute a) 5 c. c. de la solution de papaïne à 2 0/0, b) 5 c. c. de la même solution portée à 100° pendant 5 minutes. Aux deux mélanges on ajoute après 5 minutes de contact une quantité d'alcool absolu telle que le titre alcoolique soit au voisinage de 70 0/0. Quand les précipités formés n'augmentent plus, on les jette sur des filtres tarés. On lave à l'alcool à 70°, on dessèche jusqu'à constance de poids et on pèse.

Les poids des précipités sont respectivement :

a)	480 mgr
b)	473 mgr

Un échantillon c) identique au premier porté à la température d'ébullition puis amené après refroidissement au titre alcoolique de 70° donne un précipité égal à 205 milligrammes.

EXP. VIII. — On répète la même expérience en substituant à l'ovalbumine du sérum de cheval dilué de moitié : a) un des échantillons est additionné de 2 c. c. de la solution de papaïne à 2 0/0 ; l'autre b) de la même quantité de la solution du ferment préalablement bouillie ; tous deux sont maintenus pendant 10 minutes à la température du laboratoire, puis amenés par addition d'alcool au titre alcoolique de 70 0/0. Les précipités obtenus après dessiccation pèsent :

a)	352 mgr
b)	354 mgr

Un échantillon c) identique au premier porté rapidement à 100°, puis

amené après refroidissement au titre alcoolique de 70 0/0 ne donne qu'un précipité pesant 142 ^{msr}.

Dans cette expérience comme dans la précédente, les filtrats des échantillons a) ne donnent après évaporation de l'alcool, qu'une légère coloration bleu violet, lorsqu'on essaie sur eux la réaction du biuret. Les filtrats des échantillons c) donnent au contraire la coloration rose caractéristique des peptones, même après dilution très forte des liquides originels.

On peut donc conclure de ces expériences que les produits de digestion qui apparaissent dans les filtrats des mélanges soumis à la coagulation par la chaleur ne se forment pas, au moins en un espace de temps très court, aux températures ordinaires.

On pourrait objecter avec raison que ces expériences ne prouvent pas d'une façon absolue qu'il ne se fait aucune transformation aux températures ordinaires. Au titre où nous l'avons employé, l'alcool ne permet pas, en effet, la séparation complète des produits de digestion et des matières albuminoïdes qui leur ont donné naissance. Les hétéroprotéoses, par exemple, en raison de leur faible solubilité ne peuvent être séparées directement en utilisant ce réactif. Nous savions à vrai dire que ces produits n'existent pas ou ne se trouvent qu'en quantité très faible dans les filtrats des mélanges soumis à la coagulation. Mais on pouvait supposer qu'ils se forment à la température ordinaire et qu'ils sont transformés en produits plus avancés, d'où plus solubles, lors du passage des mélanges à une température plus élevée. Ce fait serait d'ailleurs de peu d'importance et ne modifierait guère la conclusion générale qu'on peut déjà tirer de ces expériences, à savoir que la plus grande partie du phénomène de digestion que nous avons observé se produit brusquement à haute température.

Précipitation par l'acide trichloracétique. — Nous avons cependant réussi à lever tous les doutes en ayant recours à une méthode qui, à elle seule, permet de démontrer qu'aux températures ordinaires aucune digestion ne se produit. Cette méthode, basée sur l'emploi de l'acide trichloracétique, a déjà été employée dans le but de séparer plus complètement que par le chauffage en milieu faiblement acide, les albuminoïdes naturels de leurs produits de transformation. Martin (1), dont nous avons exactement suivi les indications, a fait une étude détaillée de cette méthode, qu'il a d'ailleurs appliquée à la re-

(1) MARTIN, *Journal of Physiology*, t. XV, p. 375.

recherche des albumoses et des peptones dans le sang. Nous nous sommes à nouveau assuré de sa validité au point de vue de la séparation des différents produits en utilisant des mélanges artificiellement préparés. Voici la technique qu'il convient d'employer.

De l'acide trichloracétique à 10 0/0 est ajouté à volume égal aux liquides à éprouver. Il se forme immédiatement un abondant précipité qui renferme toutes les matières albuminoïdes originelles et une minime fraction des albumoses s'il en existe dans les liquides; ces dernières étant totalement solubles à chaud dans le liquide acide, il suffit d'une courte ébullition suivie immédiatement de la filtration du liquide bouillant pour les séparer complètement des matières albuminoïdes naturelles qui restent précipitées.

On voit que cette méthode comporte, pour la séparation des matières albuminoïdes, une ébullition comme la méthode que nous avons utilisée dans nos premières expériences et on pouvait craindre *a priori* qu'elle ne donne les mêmes résultats. Les conditions dans lesquelles on opère diffèrent cependant par l'acidité considérable du milieu et la nature de l'acide employé et l'on pouvait penser que dans ces conditions le ferment est mis dans l'impossibilité d'agir pendant le chauffage. L'expérience prouve qu'il en est bien ainsi et démontre du même coup qu'il n'y a aucune digestion aux températures ordinaires. En portant à la température d'ébullition, après addition d'acide trichloracétique, deux échantillons dont l'un renferme le mélange de sérum et de papaïne active, l'autre le mélange de sérum et de papaïne chauffée, on obtient dans les deux échantillons le même poids de matières coagulées comme le montrent les quelques expériences suivantes :

Exp. IX. — Un mélange *a*) contenant 15 c. c. d'albumine d'œuf diluée au 1/3 et 5 c. c. de la solution de papaïne à 2 0/0 est porté après addition de 2 gouttes d'acide acétique à la température de 100°. Après quelques instants, on ajoute un volume égal d'acide trichloracétique à 10 0/0, et l'on fait bouillir à nouveau. On jette le liquide bouillant sur un filtre taré, on lave d'abord avec une solution trichloracétique, puis à l'eau distillée bouillante. Le précipité est jeté sur un filtre taré et desséché jusqu'à constance du poids.

Un mélange *b*) identique au premier est additionné d'emblée d'acide trichloracétique, soumis à la température d'ébullition, puis traité comme le précédent.

Un troisième mélange c) dans lequel la papaïne active a été remplacée par du ferment préalablement bouilli, est également précipité d'emblée par l'acide trichloracétique, puis porté à 100° et traité comme les deux précédents.

Les trois précipités donnent respectivement les poids suivants :

a)	317 mgr
b)	580 mgr
c)	573 mgr

Exp. X. — On répète l'expérience précédente en substituant à l'albumine d'œuf du sérum de cheval dilué au 1/3; les mélanges a) et b) renfermant 15 c. c. de sérum et 2 c. c. de la solution de papaïne à 2 0/0. Dans le mélange c) on a remplacé la papaïne active par une quantité égale de la solution de ferment préalablement bouillie.

a) est coagulé par la chaleur en milieu faiblement acétique, puis additionné d'acide trichloracétique, bouilli à nouveau et filtré à chaud.

b) est additionné d'emblée d'acide trichloracétique et porté ensuite à l'ébullition.

c) est traité exactement comme le précédent.

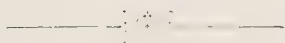
Les pesées des précipités ont donné les chiffres suivants :

a)	190 mgr
b)	437 mgr
c)	432 mgr

On peut remarquer que, dans cette expérience comme dans la précédente, le poids du précipité de l'échantillon témoin c, c'est-à-dire de l'échantillon contenant la papaïne chauffée, est légèrement inférieur à celui de l'échantillon contenant la papaïne active et précipité d'emblée comme le précédent par l'acide trichloracétique. On verra plus loin que ce fait s'explique par une digestion brusque des albuminoïdes naturels associés au ferment, digestion qui se produit lors du chauffage préalable de la solution de papaïne. C'est pour la même raison que dans l'expérience VI la quantité d'azote coagulable du précipité de l'échantillon c s'est montré un peu plus faible que celle de l'échantillon b.

C'est donc bien pendant le court passage de la température du laboratoire à la température d'ébullition que se fait la digestion si intense que nos premières expériences avaient mise en évidence. En fait le procédé généralement employé pour arrêter un phénomène de protéolyse et en mesurer l'effet se trouvait être dans le cas particulier la véritable cause déterminante de la digestion observée.

Une expérience d'ailleurs très simple peut donner une idée de la rapidité surprenante avec laquelle peut s'effectuer à température élevée le phénomène de protéolyse que nous étudions. Dans toutes les expériences citées jusqu'ici, le temps que mettent les mélanges pour passer de la température ordinaire à 100° est petit, mais mesurable. Si, au contraire, nous projetons un tel mélange par gouttes isolées dans l'eau acidulée bouillante, l'élévation de température est pour ainsi dire instantanée. Cependant, on observe encore dans ces conditions une digestion appréciable. Celle-ci est toutefois d'autant plus faible que les gouttes sont plus petites et plus espacées, mais elle n'est jamais rigoureusement nulle.



CHAPITRE III

CONDITIONS ET LIMITES DE TEMPÉRATURE DANS LESQUELLES SE PRODUIT LA DIGESTION BRUSQUE. ESSAI D'INTERPRÉTATION

Il n'entre pas dans notre plan d'étudier en détail les conditions dans lesquelles peut se manifester l'activité de la papaine. Nous voudrions seulement pouvoir déterminer les causes de la brusquerie par laquelle le phénomène que nous avons signalé se différencie des autres phénomènes de digestion étudiés jusqu'ici.

Un caractère qui distingue certainement la digestion brusque est la température élevée à laquelle elle se produit. Nos précédentes expériences ont établi en effet que, dans les conditions où nous nous étions placé, cette digestion ne débute qu'au-dessus de 40° et l'on pouvait assez facilement être amené à penser que la majeure partie de la transformation ne s'accomplit qu'à des températures bien plus élevées encore. Il paraissait donc désirable de préciser avant tout le rôle que peuvent jouer les diverses températures auxquelles sont successivement soumis les mélanges d'albumine et de ferment que l'on amène rapidement à la température d'ébullition.

Le procédé qui se présente naturellement à l'esprit pour faire cette étude est de répéter sur plusieurs échantillons l'expérience de digestion brusque en arrêtant, pour chacun d'eux, l'action du ferment au moment où le mélange passe par une température convenablement choisie. Pratiquement, on est amené à modifier un peu la technique : on chauffe les mélanges, placés dans un tube à parois minces, dans un bain de température réglée et l'on arrête l'action dès qu'ils ont atteint la température choisie. En opérant de cette manière, le chauffage n'est évidemment pas aussi rapide que dans les expériences précédentes où l'on chauffait à feu nu et les derniers degrés sont surtout lents à franchir malgré la précaution prise de tenir le bain à une température un peu supérieure à celle qu'on veut atteindre. Bien que les

quantités de matière digérée soient certainement un peu plus grandes, pour chaque température, que dans l'expérience schématique imaginée tout d'abord, les rapports de ces quantités pour deux températures, de part et d'autre identiques, ne doivent pas être fortement modifiés (1).

EXP. XI. — On fait une série de mélanges contenant 10 c. c. d'albumine d'œuf diluée de moitié et 3 c. c. de solution de papayotine à 20/0; ces mélanges sont portés dans une série de bains réglés à des températures progressi-

TEMPÉRATURES ATTEINTES	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin.....	558 milligr.	"
45°.....	555 milligr.	"
50°.....	557 milligr.	"
55°.....	552 milligr.	"
60°.....	550 milligr.	"
65°.....	546 milligr.	42 milligr.
70°.....	535 milligr.	23 milligr.
75°.....	488 milligr.	72 milligr.
80°.....	351 milligr.	207 milligr.
85°.....	512 milligr.	246 milligr.
90°.....	280 milligr.	338 milligr.
95°.....	301 milligr.	257 milligr.

(1) Il n'en serait pas ainsi pour les températures les plus élevées pour lesquelles la vitesse de passage par les températures intermédiaires joue un rôle important (voir dans l'expérience ci-dessous le résultat obtenu pour la température de 95°).

vement croissantes; les bains sont à 5° environ au-dessus des températures auxquelles on se propose d'arrêter l'action. Quand la température voulue est atteinte, on ajoute rapidement à chaque échantillon un volume égal d'acide trichloracétique à 10 0/0, on porte jusqu'à 100°, on recueille les précipités sur des filtres tarés, on lave d'abord avec la solution d'acide trichloracétique chaude, puis avec de l'eau bouillante. Les précipités desséchés jusqu'à constance de poids donnent les résultats ci-dessus.

Dans cette expérience, on constate que la digestion ne commence réellement à se manifester qu'au voisinage de 65°. A peine marquée à cette température, elle augmente notablement à 75° et subit un accroissement très considérable entre 80° et 90°. Lorsque la température d'arrêt est supérieure à 90°, la quantité totale de matière digérée diminue légèrement. Ce n'est pas qu'au delà de cette température l'action du ferment ne puisse se continuer au moins pendant le temps très court où il reste en contact avec la matière albuminoïde, mais parce que, avec la technique employée, la zone comprise entre 75° et 90° qui est la plus favorable à la digestion est beaucoup plus rapidement franchie que lorsque les températures de 80°, 85° et 90° sont prises comme températures d'arrêt. Il résulte des données précédentes que dans les chauffages instantanés, la majeure partie de la transformation observée se produit au voisinage de 80°-90°. Pour donner une idée de la rapidité de la digestion à ces températures, nous dirons que, dans l'expérience ci-dessus, le temps de passage entre 75° et 90° n'était que de 20 secondes environ, 90° étant la température d'arrêt.

On peut d'ailleurs mettre en évidence d'une façon particulièrement nette le rôle de ces températures en modifiant l'expérience de manière à exagérer l'effet de la température maxima atteinte dans chaque cas. Il suffit pour cela de maintenir les mélanges à ces températures pendant un temps donné. On constate, que, dans ces conditions, la quantité de matière transformée, en 10 minutes par exemple, au voisinage de 80°-90° est toujours nettement plus considérable que celle qu'il est possible d'obtenir en prolongeant pendant le même temps l'action du ferment à des températures plus élevées.

Exp. XII. — On fait comme dans l'expérience précédente une série de mélanges contenant 10 c. c. d'albumine d'œuf diluée de moitié et 3 c. c. de papaïne à 2 0/0; ces mélanges sont chauffés par groupe de deux dans une série de bains dont la température est supérieure de 5° à celle que l'on

veut atteindre ; dès que cette température est obtenue, on précipite aussitôt dans l'un d'eux (1^{re} série) les albuminoïdes par un volume égal d'acide trichloracétique à 10 0/0. L'autre (2^e série) est en même temps porté dans un autre bain réglé exactement à la température choisie et y est maintenu pendant dix minutes, puis traité comme le précédent. Les chiffres du tableau suivant indiquent parallèlement pour ces diverses températures maxima l'intensité de la digestion dans les deux séries d'échantillons.

TEMPÉRATURES	QUANTITÉ d'albumine digérée. (1 ^{re} série)	QUANTITÉ d'albumine digérée. (2 ^e série.)
Témoin	584 milligr.	.
65°	18 milligr.	37 milligr.
70°	24 milligr.	45 milligr.
75°	89 milligr.	246 milligr.
80°	184 milligr.	391 milligr.
85°	244 milligr.	422 milligr.
90°	292 milligr.	445 milligr.
95°	270 milligr.	353 milligr.

Les résultats obtenus avec les échantillons de la première série corroborent ceux qui ont été fournis par l'expérience précédente. Si on les compare à ceux de la deuxième série, on constate que, pendant la période de température constante, le ferment continue à digérer très activement l'albumine à 80°-85° et même 90°. A 95°, bien que la quantité totale digérée pendant la période d'ascension diminue légèrement pour les raisons exposées plus haut, on voit que cependant le ferment conserve encore une activité notable. Nous verrons d'ailleurs plus loin que son action à cette température ne s'exerce, et avec une intensité décroissante, que dans les tout premiers instants. Il en résulte

que son activité à cette température doit encore être considérable si on la limite à un temps initial suffisamment court.

En même temps que ces expériences montrent d'une manière très saisissante l'importance de la digestion au voisinage de 80°-90°, elles permettent d'observer facilement dans les mélanges en digestion une modification brusque d'aspect qui coïncide avec cette augmentation subite de l'activité du ferment : à une simple opalescence qui apparaît déjà vers 60°-65° et qui décèle évidemment un début de coagulation de la matière albuminoïde (globulines) succède, lorsqu'on atteint 80°, un trouble général du liquide, avec formation de grumeaux, qui correspond à la coagulation de l'albumine. C'est d'ailleurs vers cette même température que l'ovalbumine chauffée seule commence à se coaguler. Mais, à l'inverse de ce que l'on observe dans ce dernier cas, le début de coagulation en présence du ferment ne donne pas lieu à la formation de masses compactes ; si la quantité de papaine ajoutée est suffisante, le liquide se transforme même d'emblée en une masse homogène presque gélatineuse, grâce évidemment à la digestion qui intervient déjà d'une façon intense dans un espace de temps très court. Par chauffage à une température encore plus élevée, le liquide devient laiteux. Quand on précipite les mélanges par l'acide trichloracétique, on obtient un faible précipité granuleux au lieu du gros précipité floconneux que donnent les mélanges non digérés. L'albumine portée brusquement à température élevée subit donc au voisinage de 80° un début de coagulation, une *dénaturation* à laquelle il faut vraisemblablement attribuer la rapidité avec laquelle elle subit l'attaque du ferment. Il est d'ailleurs facile de montrer expérimentalement que de l'albumine chauffée seule à 80°, en solution diluée, se laisse ensuite attaquer assez aisément par la papaine à 40°, température à laquelle l'albumine crue résiste très fortement à la digestion, ainsi que nous l'avons vu précédemment.

Si la papaine est incapable de digérer à des températures aussi élevées l'ovalbumine coagulée en masse, c'est que celle-ci, n'offrant qu'une faible surface d'attaque et se laissant difficilement imbiber, le ferment est fortement atténué ou même détruit avant d'avoir pu provoquer une transformation nettement appréciable. Au contraire, on peut retrouver le phénomène de digestion

Brusque en s'adressant à un albuminoïde coagulé mais dilué, de manière que la coagulation, au lieu de se faire en masse, donne un liquide laiteux tenant en suspension l'albumine à l'état très divisé. La digestion est cependant toujours moins intense avec l'albumine ainsi coagulée qu'avec l'ovalbumine naturelle.

La digestion brusque s'accomplit donc à haute température et surtout au voisinage de 80°-90°. Elle a pour cause, d'une part, l'activité que la papaine possède à cette température à l'exclusion des ferments protéolytiques animaux détruits bien au-dessous, d'autre part, le début de coagulation que l'albumine subit vers cette température et qui la livre à la fois dénaturée et à l'état de division extrême, à l'action du ferment qui lui est intimement mêlé.

En somme, ce n'est pas de l'albumine crue qui est digérée par la papaine au voisinage de 80°, mais de l'albumine déjà dénaturée par la chaleur.

Il est vraisemblable que la transformation partielle qui se produit dans le phénomène de digestion brusque au-dessous de cette température n'a lieu qu'à la faveur d'une dénaturation de la petite quantité de globulines contenues dans le blanc d'œuf. On sait en effet que ces substances subissent la coagulation par la chaleur à des températures plus basses que l'ovalbumine proprement dite.

On a choisi, comme type pour ces expériences, l'ovalbumine, parce que des essais préliminaires ont montré que les résultats obtenus sont en grandeur plus réguliers que ceux que donne le sérum sanguin. Avec le sérum, en effet, l'intensité et aussi dans une certaine mesure, la marche de la digestion, varient avec l'espèce animale. Ces variations tiennent certainement pour une grande part à des différences de composition et aussi de coagulabilité des matières albuminoïdes. En règle générale, on observe d'ailleurs, lorsqu'on s'adresse au sérum, que la transformation suit à partir des températures peu élevées une marche plus régulièrement progressive que celle de l'ovalbumine.

Les sérums étant infiniment plus riches que le blanc d'œuf en globulines, il est probable qu'une quantité plus grande de matière se trouve à des températures plus basses, dénaturée et par suite soumise à une brusque transformation. Aussi n'est-il pas étonnant qu'en s'adressant aux sérums, on ne retrouve pas

toujours, vers 80°, la brusque croissance de digestion observée avec l'albumine d'œuf.

Exp. XIII. — Une série de mélanges contenant 10 c. c. de sérum de cheval dilué de moitié et 2 c. c. de solution de papaïne à 2 0/0 sont portés dans des bains réglés à des températures différentes où ils sont maintenus pendant 10 minutes. Au bout de ce temps ils sont traités par de l'acide trichloracétique suivant la technique habituelle.

TEMPÉRATURES d'action.	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin	429 milligr.	.
36°	306 milligr.	123 milligr.
60°	251 milligr.	178 milligr.
65°	212 milligr.	217 milligr.
72°	153 milligr.	276 milligr.
80°	134 milligr.	295 milligr.

Certains sérums, très attaquables par digestion brusque, à des températures relativement peu élevées, se laissent même digérer assez rapidement à l'étuve à 40°. Le sérum de lapin, par exemple, pent, toutes conditions égales d'ailleurs, être digéré d'une façon très appréciable en quelques heures à 40°. Mais ce n'est pas ce que l'on observe le plus habituellement. L'expérience suivante, faite avec le sérum de cheval qui semble présenter une résistance moyenne à l'activité de la papaïne, nous fournit d'ailleurs un exemple de la marche d'une digestion des albuminoïdes du sérum à la température de 40°.

Exp. XIV. — À 40 c. c. de sérum de cheval dilué de moitié d'eau physiologique et filtré sur bougie Berkefeld, on ajoute 10 c. c. de solution de papaïne

à 2 0/0 également filtrée sur bougie; on porte à l'étuve à 40° et on fait à divers intervalles des prises aseptiques de 10 c. c.; on précipite d'emblée les albuminoïdes coagulables par un volume égal d'acide trichloracétique à 10 p. 0/0 en employant la technique habituelle. Un échantillon précipité au point de départ sert de témoin.

Le tableau ci-dessous indique l'intensité de la digestion à 40° au bout de temps variables.

DURÉE DE SÉJOUR à 40°.	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin.....	342 milligr.	»
1 heure.....	331 milligr.	11 milligr.
3 heures.....	318 milligr.	24 milligr.
24 heures.....	287 milligr.	53 milligr.
48 heures.....	264 milligr.	78 milligr.

Il est intéressant de signaler ici que le phénomène de digestion brusque peut être également observé avec des albuminoïdes naturels d'origine végétale. Un cas particulier, intéressant à notre point de vue est précisément celui de la solution de papaïne prise seule et chauffée brusquement. Au ferment sont en effet associés dans le latex et dans la préparation commerciale dont nous nous sommes servis, des matières albuminoïdes coagulables qui se digèrent presque complètement par chauffage brusque : les auteurs ont généralement été induits en erreur par cette digestion et ont été conduits à penser que le ferment était, à l'état naturel, associé presque exclusivement à des albumoses ou à des peptones. Nous aurons l'occasion d'insister un peu plus loin, sur l'intérêt que présente au point de vue de notre étude, ce phénomène que nous nous bornons à signaler ici très brièvement.

*
* *

A côté de la digestion de la matière albuminoïde se produit

un autre phénomène qui limite le premier, c'est la destruction du ferment. Bien qu'elle soit plus résistante à l'action de la chaleur que les autres diastases protéolytiques, la papaine chauffée seule ne supporte que pendant quelques minutes les températures supérieures à 90°. A 100°, elle est même détruite presque instantanément. Sa destruction rapide à ces températures se produit également en présence de l'albumine : c'est ce qui explique que si l'on prolonge l'action du ferment, les digestions sont à partir de 90° d'autant plus faibles que la température à laquelle on opère est elle-même plus élevée.

Déjà vers 85°, par exemple, où l'on observe une digestion considérable, quand on se borne à élever rapidement les mélanges jusqu'à cette température, l'action ne se continue guère que pendant quelques minutes, et décroît rapidement de minute en minute. La période totale d'activité est encore plus courte et la décroissance plus rapide si l'on considère des températures plus élevées.

* Ce fait est facile à mettre en évidence en portant dans des bains à température réglée une série de mélanges dont on arrête l'action de deux en deux minutes, à partir du moment où la température choisie est atteinte. Inutile de faire remarquer qu'il est nécessaire pour donner à l'expérience toute sa valeur démonstrative de ne pas employer des quantités trop fortes de ferment qui pourraient provoquer d'emblée la transformation de la plus grande partie de la matière à digérer.

Exp. XV. — On fait une série de mélanges d'albumine d'œuf diluée de moitié (10 c. c.) et de solution de papaine à 2 0/0 (2 c. c.).

Les mélanges, rapidement amenés comme précédemment aux températures qu'on veut atteindre, sont portés dans des bains réglés respectivement à ces températures (85° et 95°). Dès que la température maxima est atteinte, on ajoute à l'un des mélanges de chaque série un volume égal d'acide trichloracétique à 10 0/0. La même opération est répétée de deux en deux minutes sur les autres échantillons; tous sont alors portés à l'ébullition et filtrés à chaud. Les précipités traités comme précédemment donnent les poids indiqués dans le tableau ci-dessous.

DURÉE DE SÉJOUR à température constante.	QUANTITÉ d'albumine digérée (85°).	QUANTITÉ d'albumine digérée (95°).
Témoins.....	598 milligr.	593 milligr.
Période d'ascension.....	206 milligr.	237 milligr.
2 minutes	334 milligr.	299 milligr.
4 minutes	384 milligr.	308 milligr.
6 minutes	398 milligr.	313 milligr.
8 minutes	409 milligr.	312 milligr.
12 minutes	415 milligr.	309 milligr.
16 minutes	418 milligr.	314 milligr.

Il n'est pas douteux que la marche très particulière de ce phénomène ne doive être rapportée à une destruction rapide du ferment au voisinage des températures où il manifeste pour ainsi dire instantanément une activité considérable.

Cette destruction rapide de la papaine ne nous arrêterait pas davantage si nous ne savions d'autre part que ce ferment, mis en présence de l'ovalbumine et du sérum naturels, subit une destruction déjà intense aux températures ordinaires.

On se rappelle que c'est à cette destruction de la papaine en présence de la matière albuminoïde que nous avons été tenté de rapporter provisoirement la régression apparente de la digestion, observée dans nos premières expériences. Nous montrerons plus loin que cette destruction paraît bien due à une action spécifique des liquides albuminoïdes naturels; déjà très intense à la température du laboratoire, elle s'accuse au fur et à mesure que la température s'élève et à 40° par exemple, où il peut cependant se produire à la longue une faible digestion. l'atténuation du fer-

ment est déjà plus rapide qu'à 20°. A des températures encore plus élevées, à 50°-60° par exemple, l'atténuation se marque davantage encore, bien que la puissance digestive du ferment croisse très vite. L'expérience montre, en effet, qu'un mélange d'albumine du sérum et de papaine préalablement soumis à la température de 56° et porté ensuite brusquement à 100° donne au total une digestion moindre qu'un mélange semblable fait en même temps, mais porté d'emblée de la température du laboratoire à celle de 100°.

Exp. XVI. — On fait 2 mélanges contenant 15 c. c. de sérum de bœuf dilué au tiers et 4 c. c. de papaine à 4 0/0. L'un des mélanges *a*) est porté d'emblée à la température d'ébullition en milieu légèrement acétique, L'autre *b*) est traité de la même façon après avoir été porté au préalable à la température de 56° pendant 10 minutes; un troisième échantillon *c*) identique aux précédents, mais dans lequel on a remplacé la solution de papaine par une égale quantité de ferment préalablement bouilli sert de témoin. Les chiffres ci-dessous indiquent le poids des précipités obtenus :

<i>a</i>)	60 mgr
<i>b</i>)	71 mgr
<i>c</i>)	321 mgr

Il est certain qu'à des températures plus élevées, l'ovalbumine ou le sérum chauffés un certain temps, perdent leur pouvoir d'atténuer l'activité du ferment. Porté à 80° pendant une demi-heure, le sérum, par exemple, se laisse non seulement attaquer aisément à la température de 40°, comme nous l'avons dit plus haut, mais il a perdu totalement ou presque totalement la propriété d'atténuer, par contact à cette température, l'activité de la papaine. Ainsi la dénaturation qui rend l'albumine plus attaquable, la prive en même temps de son pouvoir destructeur pour le ferment.

Nous ne savons pas toutefois si cette propriété de la matière albuminoïde se perd brusquement aux températures élevées, et par suite dans quelle mesure cette action spécifique des substances à digérer peut intervenir dans le phénomène de la digestion brusque, concurremment avec les agents ordinaires de destruction (chaleur, réaction de milieu), pour limiter à haute température l'action du ferment. Quoi qu'il en soit, la rapidité de cette destruction est assez grande aux températures supérieures à 80°-85° pour limiter presque au phénomène de digestion

instantanée, d'ailleurs considérable, l'action de la diastase à haute température.

*
* *

En somme, *le phénomène de digestion brusque nous apparaît comme la résultante d'une série d'actions exercées par les températures élevées sur le ferment et la matière à digérer*. La papaine qui est capable de développer à ces températures une activité considérable, se trouve intimement mêlée à des substances que la chaleur modifie brusquement et rend dès lors très faciles à attaquer. A température élevée, le ferment perd rapidement, il est vrai, son action protéolytique, mais dans la lutte de vitesse qui s'engage entre la digestion et la destruction du ferment, l'avantage reste toujours à la digestion quelle que soit la rapidité avec laquelle l'on franchisse ou l'on dépasse les températures qui semblent lui être le plus favorables.

La rapidité avec laquelle la papaine peut manifester son action tient à ce que, dans les conditions de nos expériences, elle n'agit, ni sur une albumine vraiment crue, ni sur la même substance coagulée en masse par la chaleur, mais sur le corps *en voie de coagulation*, ayant perdu la résistance spéciale qu'il doit à son état naturel, n'ayant pas atteint cette compacité physique qui lui permet de n'offrir au ferment qu'une surface d'attaque minime.

On sait que les albuminoïdes naturels sont en général très résistants à l'action des ferments protéolytiques, qu'un début de coagulation (par les acides, la chaleur, etc.), les rend plus facilement attaquables; *l'activité particulière de la papaine, dans les conditions où nous nous sommes placé tient précisément à ce qu'elle est, à l'inverse des autres ferments plus thermolabiles, très active aux températures qui commencent à coaguler les albuminoïdes*.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA RÉACTION DE MILIEU. — ÉTUDE
DES PRODUITS DE TRANSFORMATION

Il était intéressant de déterminer dans quelle mesure la réaction de milieu peut influencer le phénomène de la digestion brusque de l'ovalbumine par la papaine. On sait qu'un des caractères qui distinguent ce ferment de la pepsine et de la trypsine c'est qu'il peut agir à la fois en milieu neutre et en milieu faiblement alcalin ou faiblement acide. Les nombreuses recherches entreprises dans le but d'étudier la réaction la plus favorable à la digestion papainique ont donné lieu aux résultats les plus contradictoires. On a tour à tour considéré la réaction neutre, la réaction faiblement acide, la réaction faiblement alcaline comme étant celle qui convenait le mieux à l'action du ferment. Ces divergences sont le plus souvent difficiles à expliquer, mais il est certain que la plus ou moins grande pureté des préparations de ferment employées, comme aussi la nature et l'état de la matière à digérer peuvent modifier dans une large mesure les résultats des expériences.

Il ressortait de nos premières recherches qu'une réaction faiblement acide n'empêche en aucune façon le phénomène de la digestion brusque de se produire, puisque les résultats observés avaient été obtenus en portant à l'ébullition des mélanges d'ovalbumine et de papaine préalablement acidifiés par l'acide acétique. Mais nous avons observé d'autre part que la digestion est encore plus intense lorsqu'on porte les mélanges d'albumine et de ferment à la température d'ébullition sans acidification préalable, c'est-à-dire lorsqu'on ne modifie pas la réaction légèrement alcaline des liquides albuminoïdes naturels sur lesquels on opère.

Il y avait donc lieu d'étudier d'un peu plus près dans quelle mesure peut varier le phénomène de digestion brusque lorsqu'on fait croître progressivement l'acidité ou l'alcalinité du milieu. L'expérience nous montra qu'en présence d'un acide organique,

l'acide acétique par exemple, la quantité de matières transformées se réduit de plus en plus quand l'acidité du milieu augmente, mais que l'on peut cependant observer encore des digestions très importantes en présence de quantités d'acide relativement considérables.

Avec certains échantillons de ferment, qui se montraient tout particulièrement actifs en milieu très acide, nous avons réussi à obtenir des digestions encore très appréciables en présence de concentrations d'acide acétique atteignant 8 et même 10 0/00.

C'est ce que montre en particulier l'expérience ci-dessous :

EXP. XVII. — Divers mélanges contenant 10 c. c. d'albumine diluée et 3 c. c. de solution de papaine à 20/0, sont amenés à une acidité progressivement croissante par une addition d'acide acétique, puis portés dans un bain d'eau bouillante où ils sont maintenus pendant 5 minutes; l'intensité de la digestion est mesurée comme d'ordinaire par la méthode de l'acide trichloracétique

ACIDITÉ	POIDS des réceptés.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin.....	492 milligr.	»
0 0/00.....	443 milligr.	379 milligr.
0 5 0/00	475 milligr.	317 milligr.
1 0/00.....	252 milligr.	240 milligr.
2 0/00.....	312 milligr.	180 milligr.
5 0/00.....	335 milligr.	157 milligr.
8 0/00.....	380 milligr.	112 milligr.
10 0/00.....	422 milligr.	70 milligr.

En présence des acides forts, l'acide chlorhydrique par exemple, l'activité du ferment est déjà très fortement diminuée, quelquefois même complètement supprimée, quand la concentration du milieu atteint 0,5 à 10/00. Au delà de cette concentration, le phénomène de digestion brusque peut encore s'observer exceptionnellement, avec certaines préparations de ferment, sans qu'on puisse d'ailleurs s'expliquer la cause de ces particularités.

L'activité du ferment peut se manifester également avec des concentrations assez variées en carbonate de soude. La digestion du sérum, par exemple, n'est guère diminuée lorsqu'au lieu d'opérer en présence de la faible alcalinité du milieu naturel on opère en présence de carbonate de soude à 2 ou 30/00; même en présence de carbonate de soude à 100/00, on observe encore quelquefois une faible digestion.

EXP. XVIII. — A des mélanges contenant 10 c. c. de sérum de cheval dilué au 1/3 et 2 c. c. de la solution de papaine, on ajoute des doses progressivement croissantes de carbonate de soude; on porte les divers échantillons à la température d'ébullition et on évalue par pesée du précipité l'intensité de la transformation dans les divers échantillons de la série.

ALCALINITÉ en carbonate de soude.	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin	319 milligr.	»
0	449 milligr.	470 milligr.
10/00	448 milligr.	471 milligr.
2,50/00	457 milligr.	462 milligr.
50/00	480 milligr.	439 milligr.
100/00	244 milligr.	75 milligr.

Ainsi, bien que les milieux neutres ou faiblement alcalins

soient incontestablement les plus favorables à la mise en évidence du phénomène que nous étudions, l'activité de la papaïne peut cependant s'exercer, pour provoquer la digestion brusque dans des limites de réaction très étendues. Ceci peut sans doute s'expliquer par la rapidité même du phénomène qui ne laisse pas l'action combinée de la température et du milieu détruire complètement le ferment avant qu'il ait pu transformer une quantité appréciable de matière.

Le phénomène de digestion brusque qui montre une indifférence — relative tout au moins — à la réaction acide ou alcaline peut également s'observer dans des conditions de milieu où l'on ne supposerait pas *a priori* que puisse s'exercer une action diastatique. Jonescu qui a vérifié les expériences par lesquelles nous avons établi, au moyen de la précipitation par l'alcool, que les albumines naturelles ne sont pas digérées par la papaïne aux températures ordinaires, s'est demandé si par le chauffage instantané, en présence d'alcool, on n'obtiendrait pas une certaine digestion (1). Il a observé qu'en présence d'une concentration d'alcool de 75 0/0 « la quantité d'albumine digérée était un peu plus petite que dans l'expérience de contrôle ».

Il est probable cependant que le milieu alcoolique est capable d'amener la papaïne, comme tout autre ferment, à l'état inactif, mais il lui faut pour cela un temps plus long que celui que demande l'ensemble de l'expérience. En fait, nous avons répété l'expérience de Jonescu; mais, bien que nous ayons toujours observé une digestion non douteuse, nous l'avons trouvée beaucoup moins notable (1/3 ou 1/4 de la digestion observée dans l'expérience de contrôle) qu'on ne pouvait le prévoir d'après la phrase citée plus haut.

Il n'en est pas moins vrai que la digestion brusque peut, en raison de sa rapidité même, s'accommoder de conditions de milieu, comme nous l'avons vu s'accommoder de conditions de température, qui empêchent complètement la manifestation des actions diastatiques ordinaires.

* * *

Nous avons déjà signalé au début de cette étude que la digestion brusque de l'ovalbumine ou du sérum naturels donne des produits de transformation relativement avancés parmi les-

(1) JONESCU, *Loc.cit.*, p. 182.

quels on peut facilement mettre en évidence la peptone. La quantité de cette substance nous avait même paru relativement considérable ; les filtrats obtenus après précipitation des albumoses par le sulfate d'ammoniaque à saturation nous donnaient toujours en effet une réaction du biuret des plus intenses. Par contre, il ne nous a pas semblé qu'il se formait en un si court espace de temps de produits plus avancés, tels que les acides amidés par exemple.

A vrai dire, nous n'avons pas recherché systématiquement chacun des produits que l'on sait déceler dans les digestions avancées. Nous avons constaté simplement que nous n'obtenions ni la réaction du tryptophane, ni tyrosine décelable directement ou au moyen de la tyrosinase. Nous rappelons d'ailleurs que les produits de digestion avancés ne se forment pas d'ordinaire isolément et que l'absence de plusieurs d'entre eux peut faire présumer avec vraisemblance l'absence des autres. On sait d'autre part que les auteurs qui ont recherché dans des digestions très lentes par la papaïne les acides amidés n'en ont trouvé que de très petites quantités. Emmerling (1), qui a fait une étude détaillée des produits de la digestion prolongée d'une grande quantité de fibrine sèche par la papayotine de Merck, a trouvé, mais seulement en très petite quantité, des acides monoamidés ou diamidés : leucine, tyrosine, arginine, acide aspartique, etc. Harlay (2), d'autre part, a mis en évidence, dans des digestions lentes de fibrine par la papaïne, de très petites quantités de tyrosine. On sait que cet auteur a pu déceler dans ces mêmes digestions l'existence d'un produit (chromogène) que la tyrosinase colore en vert. Nous n'avons, dans nos digestions brusques, obtenu par l'addition de tyrosinase, ni le brun de la tyrosine, ni le « vert papaïque » d'Harlay.

Les produits de digestion plus avancés que la peptone étant certainement en quantité nulle ou négligeable, on n'avait plus à se préoccuper que d'évaluer la quantité d'albumoses et de peptone et l'on pouvait, sans grande erreur, au moins lorsqu'on parlait de l'ovalbumine, compter comme peptone tout ce qui, dans les produits de digestion, n'était pas précipitable par le sulfate d'ammoniaque ou le sulfate de zinc à saturation.

(1) EMMERLING, Über die Eiweisspaltung durch Papayotin, *B. der D. Chem. Ges.*, t. XXXV, 695 et 1012, 1902.

(2) HARLAY, *Thèse de l'Univers. de Paris* (Pharmacie), 1900.

Les premiers essais de recherches quantitatives nous ont aussitôt montré, comme nous l'avaient d'ailleurs fait prévoir les expériences qualitatives, que la quantité de peptone était considérable, plus considérable même que la quantité d'albumoses. Le rapport de ces deux quantités, d'ailleurs variables, ne s'est guère montré inférieur à 2 et il a dépassé quelquefois 3.

Avant de donner, à titre d'exemple, un protocole d'expérience, nous devons attirer à nouveau l'attention sur la modification que la solution de papaine elle-même subit pendant le chauffage brusque, phénomène qui complique un peu l'interprétation des expériences et laisse aux nombres obtenus une incertitude, d'ailleurs trop légère, pour qu'on ne puisse pas tirer de leur examen des conclusions certaines.

Il y a dans la solution de papaine une grande quantité d'albuminoïdes précipitables par l'acide trichloracétique, mais qui échappent à la précipitation par la chaleur dans les conditions ordinaires, en raison de ce fait qu'à haute température elles subissent et même complètement, dans certaines conditions, la digestion brusque par le ferment qui les accompagne. Ce fait, que personne ne paraît avoir observé jusqu'ici, doit être retenu, non seulement parce qu'il nous montre que les matières albuminoïdes végétales, prises à l'état naturel, peuvent subir comme les matières albuminoïdes animales une digestion brusque par la papaine aux températures élevées, mais encore au point de vue particulier de l'interprétation de quelques-uns de nos chiffres d'expérience.

Pour donner une idée de l'intensité de cette digestion, notons qu'en portant pendant 10 minutes une solution de papaine dans un bain à 100°, ce qui donne au voisinage de 100° une montée lente de la température, on obtient une digestion à peu près complète des matières albuminoïdes coagulables, du latex de papayer. Dans une première expérience faite avec la « papayotine » de Merck, sur 108^{mgr} de matières précipitables par l'acide trichloracétique, on n'a retrouvé après chauffage que 10^{mgr} environ. Dans une autre expérience où l'on avait utilisé la « papaine », 156^{mgr} de matières précipitables ne donnèrent plus, après chauffage à 100°, qu'un précipité de 4 à 5^{mgr}. Des dosages d'azote ont d'ailleurs donné des résultats comparables à ceux de ces pesées.

L'intensité de cette *autodigestion* brusque des solutions de papaine, est d'ailleurs fonction de la manière dont est conduit le chauffage, de la réaction du milieu, et éventuellement peut-être aussi des substances surajoutées.

Si donc, dans une expérience, à côté d'un échantillon d'albumine subissant la digestion brusque, on chauffe à titre de témoin un deuxième échantillon additionné de papaine préalablement portée à 100°, on introduit dans le témoin les albumoses et la peptone d'autodigestion de la papaine. Dans l'échantillon qui contient le ferment actif, les albuminoïdes qui l'accompagnent dans sa solution peuvent aussi subir l'autodigestion. Mais, outre que ni la réaction du milieu ni la courbe de montée de la température ne sont identiques dans les deux opérations de chauffage, la présence de l'albumine qu'on veut transformer peut, dans le deuxième cas, influencer d'une manière inconnue l'autodigestion. Fort heureusement, une certaine quantité de papaine est capable de digérer brusquement une quantité notablement plus considérable d'albumine et il n'y a aucun doute sur l'attribution qu'on doit faire à la majeure partie des nombres obtenus.

EXP. XIX. — A 20 c. c. d'albumine d'œuf diluée de moitié, on ajoute 10 c. c. de solution de papaine à 2 0/0 et on porte le mélange à la température d'ébullition.

On fait la même opération sur un échantillon témoin dans lequel on a remplacé la papaine active par une égale quantité de la solution de ferment portée au préalable à 100° pendant 5 minutes.

Les précipités des deux échantillons sont mis à part pour le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. Les filtrats acidifiés à 4 0/00 avec de l'acide sulfurique sont additionnés d'un égal volume d'une solution saturée de sulfate de zinc, puis amenés eux-mêmes à saturation par addition progressive de cristaux de SO_4Zn . Les précipités obtenus ainsi que les nouveaux filtrats sont également destinés au dosage d'azote.

A titre de contrôle on dose séparément l'azote de l'albumine et de celui de la papaine. D'autre part, 10 c. c. de la solution de ferment sont chauffés séparément en milieu légèrement acide. Le précipité et le filtrat qui est à son tour traité par le SO_4Zn à saturation sont utilisés pour les mêmes déterminations.

Voici sommairement les résultats des différents dosages, exprimés en milligrammes d'azote.

Azote du mélange.	{	Albumine.....	128.84
		Papaïne.....	17.02
Azote du mélange soumis à la digestion brusque.	{	Précipité par la chaleur.....	75.86
		Filtrat. { Précipité par SO_4Zn	26.12
		{ Second liquide de filtration.....	43.54
Azote du mélange témoin.	{	Précipité par la chaleur.....	125.26
		Filtrat. { Précipité par SO_4Zn	42.08
		{ Second liquide de filtration.....	9.14
Azote de la papaïne chauffée isolément 5' à 100°	{	Précipité par la chaleur.....	2.32
		Filtrat. { Précipité par SO_4Zn	7.24
		{ Second liquide de filtration.....	7.26

Il n'est donc pas douteux qu'il se forme dans la digestion brusque de l'ovalbumine, à haute température, une quantité relativement considérable de peptone. Nous nous sommes assuré, d'autre part, que les produits précipitables par le sulfate de zinc ou le sulfate d'ammoniaque à saturation, sont eux-mêmes représentés presque exclusivement par des albumoses secondaires. La transformation des matières albuminoïdes est donc poussée d'emblée, et en un temps extrêmement court, à un stade de digestion déjà très avancée.

CHAPITRE V

ACTION DU SÉRUM ET DE L'OVALBUMINE NATURELS
SUR LA PAPAINE

Nous avons indiqué précédemment que dans les mélanges de papaine et d'albuminoïdes naturels abandonnés à la température du laboratoire, la quantité de matière transformée par chauffage brusque diminuait avec le temps. Si l'on s'était vraiment trouvé en présence d'une digestion à la température du laboratoire, il eût été difficile d'expliquer ce phénomène autrement que par une rétrogradation de la digestion. Bien qu'il ait paru de prime abord difficile d'adopter cette hypothèse, on pouvait cependant invoquer en sa faveur les expériences bien connues de Danilewsky et de ses élèves sur les plastéines et les coaguloses. On sait, en effet, qu'ajoutés à des solutions d'albumoses et de peptone le lab gastrique d'une part (Okunew (1), Sawjalow (2), Lawrov (3), etc.), la papaine d'autre part (Kurajeff) (4), produisent des précipités ou des coagula (5). Cette action, dont la nature diastasique n'est pas douteuse, avait été considérée par quelques auteurs comme un véritable phénomène de synthèse donnant à partir des albumoses et des peptones des produits ayant certains caractères des albuminoïdes originels. On pouvait donc se demander si l'on n'avait pas affaire à un phénomène de cet ordre. A la suite de la digestion supposée à la température du laboratoire de l'albumine ou du sérum, les produits formés auraient pu être ramenés à un état analogue à celui des plastéines. Toutefois, au contraire de ce qui aurait dû se passer dans cette hypothèse, on n'observait dans nos liquides ni coagulum ni précipité; l'aspect du mélange ne se modifiait en aucune façon avec le temps. Dans tous les cas, il ne pouvait se produire une

(1) OKUNEW, *Jahresb. de Maly*, t. XXV, 1895, p. 291(2) SAWJALOW, *Arch. de Pfluger*, t. LXXXV, 1901, p. 171.(3) LAWROV, *Zeitschrift f. physiol. Chem.*, t. LI, p. 1.(4) KURAJEFF, *Hofmeister's Beitr.*, t. I, p. 121; t. II, p. 441; t. IV, p. 476.(5) La même observation a été faite pour le lab pancréatique par Delezenne et Mouton (*C. R. Soc. de Biol.* 27 juillet 1907). Il est intéressant de remarquer à ce propos que l'action précipitante vis-à-vis les albumoses, l'action coagulante pour le lait et l'action protéolytique se retrouvent dans le suc pancréatique comme dans le suc gastrique ou les solutions de papaine.

réversion vraie ramenant au produit initial, car un ferment, pas plus que tout autre catalysateur, ne paraît pouvoir, lorsqu'on laisse intactes les conditions physiques et la composition du milieu, conduire une réaction quelconque jusqu'à un certain point pour la ramener ensuite en arrière.

L'expérience nous ayant montré, qu'en fait, aucune digestion ne se produisait à la température du laboratoire, et que la transformation des matières albuminoïdes s'effectuait pendant le chauffage, la réduction que subissait l'intensité du phénomène, lorsqu'on prolongeait le temps de contact des mélanges à température peu élevée, devait être attribuée à une tout autre cause.

L'explication qui se présentait alors le plus naturellement à l'esprit était que le ferment subissait, du fait de son contact avec l'albumine ou le sérum, un affaiblissement croissant. On avait pu, en effet, se convaincre rapidement que l'affaiblissement spontané de la papaine abandonnée à elle-même est loin de suffire à expliquer les résultats observés.

On pouvait aussi penser que l'alcalinité naturelle des milieux albuminoïdes était la cause de la baisse d'activité de la papaine, celle-ci étant très sensible à l'action des alcalis. Mais, même dans un mélange soigneusement neutralisé, ou même *très légèrement* acidulé, le même phénomène pouvait encore être constaté. Au reste, Fritz Sachs (1) a signalé depuis qu'une alcalinité sensiblement plus forte que celle de l'albumine naturelle agit beaucoup moins sur la papaine. L'affaiblissement de la papaine en présence des albuminoïdes naturels paraît donc être dans une certaine mesure une propriété spécifique de ces liquides.

Il n'est pas impossible que ce phénomène soit lui-même de nature diastasique et que la destruction de la papaine doive être rapportée à l'action d'un ferment. Mais il nous paraît très difficile d'en fournir la démonstration. L'allure du phénomène ne s'oppose pas toutefois à cette hypothèse. Si l'on examine, en effet, la courbe que l'on obtient en portant en abscisses les temps de contact préalables des mélanges et en ordonnées les quantités d'albumine digérées (2), on voit que cette courbe tourne sa concavité vers le haut. (Courbe en trait fort de la figure 2.)

Si l'on admet que la loi de Schutz-Borissow est au moins gros-

(1) SACHS, *Loc. cit.*

(2) On trouvera dans le chapitre I^{er} plusieurs tableaux d'expérience fournissant des données analogues à celles qui ont servi à établir cette courbe.

sièrement applicable, c'est-à-dire que la quantité de matière digérée dans chaque chauffage instantané est à peu près proportionnelle à la racine carrée de la quantité de ferment présent au moment de l'opération, il en résulte que les ordonnées de la courbe, qui représente les quantités de ferment en fonction du temps, sont à peu près proportionnelles aux carrés des ordonnées de la première courbe. Cette deuxième courbe (Trait fin de la figure 2) exagère donc la concavité vers le haut de la première,

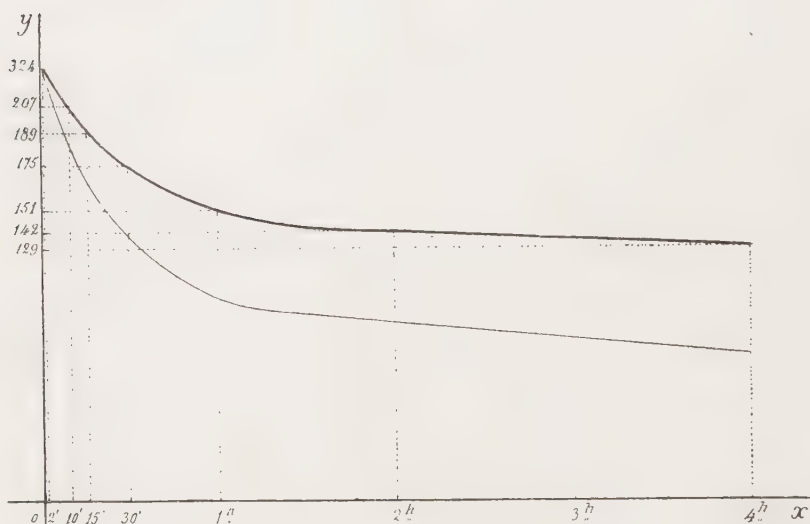


Fig. 2.

ce qui indique que la quantité de ferment décroît d'une manière d'abord très rapide, puis de plus en plus lente avec le temps. Sa forme rappelle en somme celle que l'on obtient généralement lorsqu'on représente, en fonction du temps, la loi de transformation d'une substance par une action diastasique.

Nous avons dit un peu plus haut que l'affaiblissement de la papaïne, en présence des albuminoïdes mis en œuvre dans ce travail, pouvait s'observer même dans un milieu neutre ou très légèrement acidulé. Il n'en faudrait pas conclure que ce phénomène est insensible à la réaction du milieu : il suffit d'une acidité assez faible pour qu'il perde de son intensité, et dans un mélange d'ovalbumine ou de sérum naturels et de papaïne tels que ceux qui ont été employés antérieurement, il suffit de l'addition de

0,05 0/0 d'acide chlorhydrique pour que le phénomène disparaisse entièrement. Un mélange ayant cette teneur en acide peut donc être conservé pendant des heures au laboratoire sans qu'il y ait diminution de l'albumine digérée par chauffage brusque.

EXP. XX. — Une série d'échantillons de sérum de cheval dilué au 1/3 sont additionnés de 2 c. c. de la solution de papaïne et abandonnés pendant des temps variables à la température du laboratoire. Les échantillons a) b), c), d) sont acidifiés par l'acide chlorhydrique, de façon que leur titre acide soit 0, 1 — 0, 25 — 0, 5 — et 1 0/00. Après 3 heures, les liquides sont neutralisés et portés à l'ébullition après addition de 2 gouttes d'acide acétique.

Deux mélanges e) et f) dans lesquels on n'a pas ajouté d'acide sont traités de la même façon, l'un, e) après 1 minute de contact, l'autre f) après 3 heures.

Les chiffres suivants indiquent les poids des précipités et par conséquent l'intensité de la digestion brusque dans les divers échantillons.

ÉCHANTILLONS	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin.....	296 milligr.	
e).....	126 milligr.	170 milligr.
f).....	205 milligr.	91 milligr.
a).....	207 milligr.	89 milligr.
b).....	192 milligr.	94 milligr.
c).....	120 milligr.	176 milligr.
d).....	122 milligr.	174 milligr.

Notre attention avait été attirée sur ce fait par des expériences dans lesquelles, aux mélanges qui devaient séjourner un certain temps au laboratoire, on ajoutait d'emblée la quantité d'acide acétique nécessaire pour les coaguler ensuite par la chaleur. Il y avait alors une moindre diminution de l'activité du ferment que dans les mélanges auxquels l'acide était ajouté au

moment du chauffage. Fritz Sachs (1) qui, après Jonescu, a repris nos expériences et les a confirmées, a constaté, indépendamment de nous, la conservation de l'activité du ferment en milieu acide, en présence des albumines naturelles et a publié le premier ce fait dont nos notes préliminaires n'avaient pas fait mention.

Si, au lieu de maintenir à la température du laboratoire les mélanges acidulés, on les porte à l'étuve, à 40°, non seulement on n'observe aucun affaiblissement du ferment au moment du chauffage brusque, mais même il y a à cette température une légère digestion progressive de l'albumine, bien que la réaction acide ne soit pas d'une façon générale la plus favorable à l'action de la papaïne. Peut-être les albuminoïdes naturels sont-ils à cette température rendus plus attaquables par une dénaturation lente produite par l'acide.

On pourrait même se demander si une telle dénaturation ne serait pas la cause de la conservation du ferment en milieu acide, l'albuminoïde perdant alors son pouvoir destructeur. Il ne semble pas que cette opinion puisse être adoptée : en effet, la perte du pouvoir destructeur devrait être lente et progressive; or, elle paraît se manifester dès que l'acidité du milieu est établie. On n'a d'ailleurs pas fait de recherches pour voir si cette perte est définitive ou si le rétablissement du milieu alcalin permet de manifester à nouveau l'action du liquide albuminoïde sur le ferment : la seconde hypothèse serait défavorable au rôle de la dénaturation. Quoi qu'il en soit, la dénaturation des albuminoïdes leur fait certainement perdre leur propriété de détruire progressivement l'activité de la papaïne. C'est ce que montrent les expériences où l'on ajoute à la papaïne, à la température du laboratoire, des échantillons de sérums préalablement chauffés à diverses températures. Avec le sérum chauffé à 56° pendant une demi-heure, l'affaiblissement du ferment est aussi considérable qu'avec le sérum non chauffé; avec celui qui a été porté à 65° pendant le même temps, cet affaiblissement ne se manifeste plus guère. Le sérum chauffé à 80° une demi-heure n'exerce plus aucune action; en revanche, il se laisse digérer lentement par la papaïne à la température ordinaire (2).

(1) FRITZ SACHS, *Loc. cit.*

(2) Ces dernières observations paraissent en contradiction avec le résultat noté par Jonescu qui a vu le sérum chauffé à 100° continuer à agir sur le ferment. Les conditions dans lesquelles il a effectué son chauffage (sérum dilué au 1/3 avec de l'eau distillée et porté « quelques instants » à 100°) sont d'ailleurs très différentes des nôtres et sont probablement cause de cette divergence.

CHAPITRE VI

LIQUÉFACTION DE L'ALBUMINE PAR LA PAPAÏNE AUX TEMPÉRATURES ORDINAIRES

Nous avons montré précédemment (chapitre II) que la papaïne n'exerce sur l'albumine d'œuf crue ou sur le sérum sanguin, à la température du laboratoire, aucune action digestive caractérisable par la formation d'albumoses, de peptones ou de produits plus avancés de désintégration.

Cependant, la papaïne n'est pas sans action, au moins sur l'ovalbumine, à cette température. Dès qu'on lui ajoute une petite quantité de solution de papaïne, l'ovalbumine perd instantanément sa viscosité; elle paraît, quand on l'agite dans un verre, d'une mobilité comparable à celle de l'eau et ne forme plus de mousse permanente; enfin elle s'écoule d'une pipette étroite avec facilité.

Pour avoir une mesure de la modification subie par l'albumine, nous avons employé le viscosimètre d'Ostwald (1), placé dans un thermostat transparent réglé à une température déterminée. On a reconnu qu'il y avait avantage pour obtenir des temps d'écoulement constants à faire passer plusieurs fois rapidement dans l'appareil les liquides à étudier. On les rend ainsi plus homogènes lorsqu'ils ne le sont pas encore et on les met en équilibre de température avec le thermostat.

L'albumine d'œuf diluée est rendue homogène par broyage avec un agitateur contre les parois du verre où on l'a placée, puis filtrée sur un tissu à mailles fines.

Cette albumine (2 c.c.) additionnée de moitié de son volume d'eau salée physiologique s'écoule, par exemple, dans un viscosimètre en 80 secondes à la température de 24°.

Dans les mêmes conditions, l'écoulement ne dure que 21 secondes si l'on remplace l'eau salée par la solution de papaïne à 20/0; elle dure, au contraire, 73 secondes si la papaïne a été préa-

(1) OSTWALD et LUTHER, *Phys.-chim. Mess.*

lablement chauffée 5 minutes à 100°. Ainsi la papaine chauffée perd complètement ou presque complètement son pouvoir liquéfiant, comme ses propriétés diastasiques, par un chauffage à 100°.

La liquéfaction de l'albumine par la papaine paraît être instantanée quand on se borne à la constater sans mesures, comme nous l'avons fait tout d'abord. Les mesures, nécessairement plus lentes, ne conduisent pas à une conclusion différente.

Nous avons recherché jusqu'à quelle limite inférieure de température cette liquéfaction pouvait se produire. Nous avons trouvé qu'on la constatait encore lorsque la température de l'albumine et du ferment séparés avait été abaissée jusqu'à 2° dans le thermostat refroidi, le mélange et les mesures étant faits ensuite à la même température.

Les temps d'écoulement obtenus avec des liquides de même composition que ceux qui ont été employés précédemment et avec un viscosimètre à tube plus étroit ont été de 319 secondes pour l'échantillon témoin (papaine bouillie) et de 207 secondes pour celui où le ferment était à l'état actif.

Les expériences que nous venons de rapporter donnent des résultats d'autant plus frappants que l'on s'adresse à l'albumine d'œufs très frais. Celle-ci, qui est en effet très visqueuse, est rendue instantanément tout à fait fluide par addition de papaine. L'albumine d'œufs pondus depuis longtemps a perdu spontanément une partie de sa viscosité et s'écoule beaucoup mieux, par exemple, au moment où l'on casse l'œuf; aussi l'action liquéfiante du ferment est-elle moins frappante.

Au cours des expériences rapportées ci-dessus, nous avons été amené à constater un phénomène différent de celui que nous nous proposons d'étudier. La papaine ajoutée au blanc d'œuf naturel n'y provoque, en général, aucun trouble apparent; quelquefois cependant observe-t-on un louche extrêmement léger. Au contraire, la papaine chauffée à la température d'ébullition et filtrée donne immédiatement un mélange trouble; souvent même il se forme un précipité laiteux très intense qui nage dans le liquide visqueux. C'est ce que l'on peut observer dans les mélanges témoins des expériences précédentes. Ainsi la solution de papaine bouillie possède vis-à-vis de l'ovalbumine naturelle un pouvoir précipitant qui manque à la solution non chauffée.

Nous avons recherché si le pouvoir précipitant pouvait être constaté avec de la papaine portée à de plus basses températures. Nous avons donc chauffé pendant 10 minutes à 80, 90, 100° des échantillons d'une solution de papaine à 2 0/0 et nous leur avons ajouté une certaine quantité d'albumine. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant où l'on a inscrit également le temps de passage de chaque mélange dans un viscosimètre à tube large.

Exp. XXI. — On chauffe une solution de papaine à 2 0/0 à des températures variables pendant 10 minutes. On ajoute ensuite 1 c. c. de ces solutions chauffées à des échantillons de 2 c. c. d'albumine fraîche. On note la diminution de viscosité ainsi que l'apparition du précipité.

Albumine..... 2 c. c. Eau physiologique... 1 c. c.	Le liquide passe au viscosimètre en 45".	Pas de précipité.
Albumine..... 2 c. c. Papaine 2 0/0..... 1 c. c.	Le liquide passe au viscosimètre en 12".	Louche très léger.
Albumine..... 2 c. c. Papaine chauffée à 80°. 1 c. c.	Le liquide passe au viscosimètre en 14".	Louche très léger.
Albumine..... 2 c. c. Papaine chauffée à 90°. 1 c. c.	Le liquide passe au viscosimètre en 37".	Le précipité apparaît.
Albumine..... 2 c. c. Papaine chauffée à 100° 1 c. c.	Le liquide passe au viscosimètre en 37".	Précipité très abondant.

Ainsi le pouvoir précipitant apparaît avec la papaine chauffée à 90°, mais reste bien moindre qu'avec la papaine chauffée à 100°. On remarque en même temps que la papaine chauffée à 80° conserve sensiblement sur l'ovalbumine le même pouvoir liquéfiant que la papaine non chauffée, tandis que la papaine chauffée à 90° n'exerce qu'une action liquéfiante très faible (1).

Le pouvoir précipitant de la papaine semble donc appa-

(1) On remarquera que dans cette expérience la papaine chauffée à 100° ne paraît pas avoir perdu toute action liquéfiante, au lieu que la perte de cette propriété était totale dans des expériences antérieures où le chauffage ne durait que 5 minutes. On a vu, en prolongeant le chauffage à 100° ou en élevant la température (sous pression), la papaine retrouver partiellement un certain pouvoir liquéfiant pour l'albumine.

raître à la température même (90°) à laquelle disparaît le pouvoir liquéfiant.

En raison même des conditions de température dans lesquelles il apparaît, ce pouvoir précipitant ne semble pas pouvoir être de nature diastasique. Le précipité alcoolique de la papaïne bouillie repris par l'eau ne précipite d'ailleurs plus le blanc d'œuf.

Nous avons recherché sur le sérum sanguin (de cheval) les actions liquéfiantes et précipitantes que nous avons observées avec l'ovalbumine.

Nous n'avons pu retrouver la première à la température ordinaire où les mélanges (2 c. c. de sérum, 1 c. c. de papaïne à 30/0) contenant la papaïne fraîche et chauffée s'écoulaient dans le même temps à travers le viscosimètre. Pour trouver une légère différence entre les deux mélanges il faut opérer à la température de 55°. Cette différence s'accroît encore à 65°. Mais déjà à 55°, et surtout à 65°, on se trouve en présence à la fois de la digestion et de la coagulation des matières albuminoïdes, phénomènes qui, au point de vue qui nous occupe, enlèvent toute espèce de sens aux mesures. Bien qu'aucune variation de viscosité ne décèle une action de la papaïne sur le sérum à la température ordinaire, celui-ci subit certainement une modification. Lorsqu'on le coagule, en effet, particulièrement au moyen de l'alcool, on obtient un précipité finement granuleux différent du précipité aggloméré qu'on obtient dans un mélange témoin.

Nous avons constaté enfin que la papaïne bouillie possède la propriété de donner un précipité avec le sérum de cheval comme avec l'ovalbumine.

CHAPITRE VII

DIGESTION DES TISSUS PAR LA PAPAÏNE A HAUTE TEMPÉRATURE

Les tissus portés à l'état frais dans la solution de papaïne subissent, à l'étuve, à 40°, une digestion lente. L'étude de ce fait, souvent signalé, n'a pas été poursuivie systématiquement à des températures plus élevées. En raison des données nouvelles que nous avons exposées dans les chapitres précédents, il paraissait intéressant de faire quelques essais dans cette voie.

Répétons d'abord l'expérience de la digestion des tissus à température peu élevée sous une forme analogue à celle qui lui a été donnée : portons, par exemple, un fragment de muscle dans la solution de papaïne à l'étuve à 40° : nous observerons qu'après un temps perdu assez long pendant lequel la digestion ne se traduit par aucun changement d'apparence, on voit le tissu de désagréger, fondre pour ainsi dire et enfin disparaître presque entièrement. Des fragments de divers organes (foie, rate, rein, etc.), finissent également par être digérés, mais ce n'est d'ordinaire qu'après 12, 24 et quelquefois même 36 heures que la digestion devient vraiment très appréciable à l'œil.

Si on répète les mêmes expériences en portant les fragments d'organes, plongés dans la solution de papaïne, à des températures plus élevées, on constate que la marche de la digestion est plus rapide et d'autant plus que la température s'élève davantage. Un fragment de muscle, qui ne disparaît complètement qu'au bout de 24 heures à l'étuve à 40°, peut être digéré plus qu'aux $\frac{3}{4}$, toutes autres conditions étant égales d'ailleurs, en moins de 2 heures, à la température de 70°.

Il est bien certain toutefois qu'en s'adressant à un fragment compact, on ne permet pas au ferment de manifester toute la rapidité d'action qu'il peut montrer vis-à-vis d'une matière extrêmement divisée. Nous avons déjà vu, à propos de l'albumine, quel rôle peut jouer l'état de division de la matière à digérer dans la vitesse et dans l'intensité totale de la transformation.

S'il n'était pas possible d'amener des tissus solides à former avec la papaïne un mélange même assez grossièrement homogène, on pouvait tout au moins réduire ces tissus à un état de division déjà considérable, et il était à prévoir que, dans ces conditions, la vitesse de la digestion serait beaucoup augmentée. Quelques expériences très simples, faites sur des muscles frais très finement hachés, nous ont montré qu'il en était bien ainsi.

Si, après avoir opéré à 40° dans les conditions que nous venons d'indiquer, on élève peu à peu, dans une série d'expériences successives, la température de digestion, on constate qu'une même fraction ($1/3$ ou $1/4$ par exemple) de la matière totale est transformée dans un temps de plus en plus court. Une digestion équivalente à $1/3$ de la masse totale et qui, à 40°, demandera 7 à 8 heures par exemple, se fera souvent en moins de 20 minutes à 65°-70°.

Si l'on opère à des températures plus élevées encore, l'augmentation de rapidité de la digestion avec les températures croissantes sera encore facile à observer, à la condition toutefois que la quantité de matière digérée que l'on considère ne représente pas une fraction trop considérable de la masse totale.

Si l'on suit la marche du phénomène à une température constante telle que 75°, on constate en effet qu'après avoir été très intense au début, la digestion diminue très rapidement de vitesse : son accroissement dans un temps donné tend à devenir de plus en plus petit, puis nul, de telle sorte qu'une certaine fraction de la matière échappe totalement à la transformation.

EXP. XXII. — Dans une série de tubes à essai on introduit 1 gramme de muscle de veau très finement haché et 5 c. c. d'une solution de papaïne à 2 0/0 et on porte les différents tubes dans un bain-marie réglé à 75°. De temps en temps on agite pour assurer une plus grande homogénéité du mélange. On prélève les divers échantillons à intervalles variables et on précipite par l'acide trichloracétique. Les liquides sont alors portés à la température d'ébullition et jetés sur des filtres tarés. Les précipités lavés très soigneusement avec une solution bouillante d'acide trichloracétique, puis à l'eau bouillante sont mis à dessécher jusqu'à constance de poids.

Bien que les chiffres du tableau suivant n'aient pas, comme nous l'indiquerons plus loin, une valeur absolue, ils indiquent suffisamment la marche du phénomène dans le cas particulier que nous venons d'envisager.

TEMPS D'ACTION à 75°	POIDS des précipités.	ALBUMINOILES transformés.
Témoin.....	247 milligr.	
15 minutes.....	153 milligr.	92 milligr.
45 minutes.....	130 milligr.	117 milligr.
90 minutes.....	99 milligr.	157 milligr.
2 heures.....	70 milligr.	177 milligr.
3 heures.....	62 milligr.	185 milligr.

R. 1

L'ensemble de ces phénomènes s'accuse davantage encore quand on arrive aux températures de 80°-90°. A ces températures une fraction considérable de la matière à transformer sera digérée en quelques minutes; mais le phénomène se limitera encore plus rapidement qu'aux températures immédiatement inférieures, de telle sorte que, si l'on considère, non plus l'intensité de la digestion en un temps très court, mais la quantité totale de matières transformées pendant une période assez longue, il arrivera souvent que cette quantité sera sensiblement inférieure à celle que donne une digestion prolongée à 65°-70°, par exemple. Ceci s'explique aisément, si on se rappelle que le ferment qui ne s'atténue guère à la température de 70° peut y poursuivre longtemps une action relativement faible, tandis que, vers 85°-90°, le ferment, infiniment plus actif, mais rapidement détruit, provoque dans les premières minutes une action très intense, mais rapidement arrêtée. Il est inutile de donner ici des chiffres précis dont la valeur serait souvent assez illusoire. La complexité de composition des tissus, leur manque d'homogénéité, la difficulté aussi d'épuiser après digestion les produits insolubles, contribuent à rendre incertains les résultats numériques.

Il ne résulte pas moins des observations précédentes qu'à haute température il peut se produire une digestion très rapide

des tissus. En raison de cette rapidité, il était vraisemblable qu'on pouvait obtenir dans une certaine mesure, en s'adressant aux tissus, le phénomène de la digestion brusque, tel que nous l'avons observé sur l'albumine au début de nos recherches.

L'expérience montre qu'il en est bien ainsi. A défaut d'une valeur précise qu'ils ne sauraient avoir pour les raisons indiquées plus haut, les chiffres ci-dessous donneront au moins une idée de la grandeur du phénomène.

Exp. XXIII. — On porte dans un bain-marie bouillant 2 tubes contenant : a) 10 c. c. de solution de papaine à 10/0 et 1 gramme de muscle de veau finement hachée; b) 10 c. c. de la même solution de papaine préalablement bouillie et 1 gramme de muscle de veau. Dès que la température de 98° est atteinte, on précipite par l'acide trichloracétique.

Le précipité du témoin b) pèse 254 mgr, le précipité de a) pèse 176 mgr.

Quand les expériences sont faites en chauffant brusquement en milieu légèrement acétique, on obtient des résultats du même ordre. Après coagulation par la chaleur, les filtrats donnent toujours une réaction du biuret caractéristique.

Il est intéressant de noter que, même dans le cas des tissus, le phénomène de digestion brusque peut atteindre une intensité considérable. En raison de la surface relativement réduite que présente à l'action du ferment le muscle, par exemple, même finement haché, on pouvait s'attendre à ce que la digestion soit dans un assez court espace de temps beaucoup plus limitée. Il ne faut pas oublier toutefois que nous nous trouvons encore ici en présence de matières albuminoïdes naturelles que le ferment saisit, pendant le chauffage brusque, au moment de leur dénaturation par la chaleur. On voit d'ailleurs, au moment du chauffage, toute la masse devenir floconneuse, puis se réduire en quelque sorte à une poussière qui tombe au fond du tube. Si l'on prend au contraire la même pulpe de muscle et qu'on la soumette à une cuisson préalable, elle s'agglomère; mais, même finement divisée à nouveau, elle résiste — surtout si la cuisson a été quelque peu prolongée — à la digestion brusque par la papaine de la même manière que l'ovalbumine coagulée.

CHAPITRE VIII

DIGESTION BRUSQUE PRODUITE PAR LA BROMÉLINE COMPARAISON AVEC LA PAPAÏNE

Il était intéressant de rechercher si un autre ferment protéolytique végétal, qui est déjà connu pour se rapprocher par certains caractères de la papaïne, ne donnerait pas des résultats analogues lorsqu'on en étudierait l'action dans les conditions particulières où nous nous sommes placé. Ce ferment, c'est la broméline qu'on rencontre dans le fruit de l'ananas (*Ananassa sativa*).

Signalée tout d'abord par Marcano (1), l'action protéolytique du jus d'ananas a été étudiée en détail quelques années plus tard par Chittenden (2) et ses élèves. En utilisant différents procédés d'extraction, Chittenden put isoler du jus d'ananas une diastase douée d'un pouvoir digestif très considérable. Il note en particulier que la broméline digère assez rapidement la fibrine ou l'ovalbumine coagulée en milieu neutre, acide ou alcalin; que son optimum de température d'action sur l'ovalbumine coagulée se place à un niveau assez élevé (55°-60°), qu'elle donne, lorsque son action est quelque peu prolongée, outre des albumoses et de la peptone, des acides amidés en quantité très appréciable. Il observa d'autre part qu'à la température de 40° la broméline peut digérer assez énergiquement l'ovalbumine crue fortement diluée, résultat qui doit être considéré comme suspect si l'on suppose que ce ferment est capable, comme la papaïne, de transformer les matières albuminoïdes naturelles au moment où l'on effectue la coagulation par la chaleur.

Le jus d'ananas qui contient le ferment s'obtient par simple expression du fruit coupé en petits morceaux. C'est un liquide très sucré, d'une acidité marquée, équivalente à 0,5 0/0 environ d'acide chlorhydrique. C'est à ce suc que nous nous sommes

(1) MARCANO, *Bull. of Pharmacy*, 1891, p. 77.

(2) CHITTENDEN, *Journal of Physiol.*, t. XV, 1894, p. 249

tout d'abord adresse pour essayer d'obtenir le phénomène de digestion brusque.

Si l'on ajoute à de l'ovalbumine liquide ou à du serum une quantité convenable de jus d'ananas fraîchement exprimé et filtré et qu'on porte le mélange, aussitôt fait, à la température d'ébullition, on constate comme avec la papaine une digestion très considérable. En raison de l'acidité naturelle très marquée du liquide diastasifère employé, la transformation a lieu dans le cas particulier en milieu fortement acide. On peut essayer de préciser, comme on l'a fait pour la papaine, par des pesées ou mieux par des dosages d'azote, le résultat déjà très visible au seul examen du précipité. Les pesées présentent en effet ici une assez grande incertitude à cause de la richesse du suc en substances sucrées et mucilagineuses. Malgré les lavages répétés, les filtres ne se dessèchent que très lentement et arrivent difficilement à constance de poids. Si ces incertitudes ne peuvent laisser aucun doute sur la grandeur du phénomène de digestion dans chaque cas, elles peuvent rendre difficile les comparaisons précises nécessaires pour l'étude des circonstances qui entourent la digestion.

Ces inconvénients disparaissent d'ailleurs si l'on prépare le ferment suivant l'un des procédés indiqués par Chittenden, mais l'expérience avec le suc même est tellement facile à répéter que nous avons cru devoir la mentionner tout d'abord.

Exp. XXIV. — A 15 c. c. de serum de cheval dilué au 1/3 on ajoute 5 c. c. de jus d'ananas et on porte brusquement à la température d'ébullition. Un échantillon sensible dans lequel on a substitué au liquide diastasique, le même liquide préalablement bouilli pendant 5 minutes sert de témoin. Ce liquide témoin après coagulation par la chaleur, lavages répétés et dessiccation à l'étuve, pèse un poids d'albume coagulable correspondant à 174 mg. Le précipité de l'échantillon soumis à l'action du jus frais pèse 200 mgr.

Exp. XXV. — A 15 c. c. d'albumine d'œuf diluée au 1/4 on ajoute 5 c. c. de jus d'ananas et on porte brusquement le mélange à la température d'ébullition. Le poids de matière coagulable obtenu est égal à 264 mg. L'échantillon témoin contenant le jus d'ananas préalablement bouilli donne un précipité pesant 405 mgr.

Malgré la forte acidité du milieu, la digestion observée dans ces conditions est, comme on le voit, très appréciable.

Si l'on s'adresse au jus d'ananas neutralisé au moyen du carbonate de soude on obtient des résultats analogues. Comme

pour la papaïne, la digestion observée se produit totalement pendant le court espace de temps nécessaire pour porter les mélanges d'albuminoïdes et de ferment à la température d'ébullition. Les mélanges précipités par l'acide trichloracétique avant d'avoir été soumis au chauffage ne montrent en effet aucune transformation. D'autre part, le phénomène se produit pour la plus grande part à des températures élevées. Des expériences faites sur le type de celles que nous avons rapportées en détail dans le chapitre III nous ont montré que la majeure partie de la transformation se produit ici encore au moment du passage par 80°-90°. Bien qu'aucune recherche systématique n'ait été faite sur la détermination des températures mortelles de la broméline, ce fait pouvait être prévu. Les expériences de Chittenden avaient montré en effet que dans les digestions de longue durée faites en utilisant l'ovalbumine coagulée, le ferment pouvait encore manifester une certaine activité vers 70°. En fait, des expériences systématiques entreprises dans le but d'étudier l'action de la température sur la broméline nous ont montré que ce ferment offre à l'action de la chaleur une résistance égale, peut-être même plus marquée que celle de la papaïne. Le ferment n'est que faiblement atténué par un chauffage d'une demi-heure à 80°. Il est nécessaire de le porter à une température voisine de 100° pour observer la disparition très rapide de son pouvoir protéolytique.

L'étude purement qualitative des produits de digestion brusque par la broméline nous a montré que la transformation des matières albuminoïdes est avec ce ferment, comme avec la papaïne, poussée très rapidement jusqu'au stade de la peptone. Les filtrats de digestion, précipités par le sulfate d'ammoniaque à saturation, donnent toujours, en effet, une réaction du biuret des plus nettes. Par contre, nous n'avons pu mettre en évidence dans nos liquides la présence d'acides amidés.

Un phénomène particulier de digestion brusque intéressant dans le cas de la broméline comme dans celui de la papaïne est celui de l'autodigestion du suc d'ananas à haute température. Ce phénomène, qui n'était pas connu, a induit en erreur les auteurs qui ont entrepris de déterminer la nature des matières albuminoïdes qui accompagnent le ferment. Dans son travail classique, Chittenden (1), essayant de séparer les albuminoïdes coagu-

(1) CHITTENDEN, *loc. cit.*

lables par la chaleur, effectuait à son insu la digestion brusque d'une partie de ces corps. Il en est résulté des apparences singulières qu'il a rapportées à la présence, dans les albuminoïdes associés au ferment, de substances analogues aux protéoses (protease-like body). Au reste, la description que Chittenden donne des observations faites pendant le chauffage du jus naturel rappelle immédiatement, à un lecteur prévenu, le tableau d'une autodigestion brusque. En précipitant directement le jus d'ananas par l'acide trichloracétique avant et après chauffage à 100°, on peut observer qu'il existe dans ce liquide une certaine quantité d'albuminoïdes coagulables qui se transforment en albumoses ou en peptone lorsqu'on le porte à une température élevée.

La broméline subit-elle, du fait de son contact avec l'ovalbumine ou le sérum crus, à la température ordinaire, cette atténuation progressive si importante avec la papaine et qui avait fourni avec celle-ci des résultats tout d'abord paradoxaux? On n'observe rien de tel avec le jus naturel d'ananas. Mais cela n'a point lieu de nous étonner puisque ce liquide est fortement acide et qu'en milieu acide la papaine elle-même n'est pas affaiblie par les albuminoïdes naturels.

EXP. XXVI. — On fait une série de mélanges contenant 15 c. c. de sérum de cheval dilué au 1/3 et 3 c. c. de jus d'ananas. Ces mélanges sont abandonnés à la température du laboratoire (20°) pendant des temps variables, puis portés à la température d'ébullition. Les précipités jetés sur des filtres tarés sont soigneusement lavés, desséchés et pesés jusqu'à constance de poids. Un échantillon contenant la même quantité de sérum et 3 c. c. de jus d'ananas préalablement bouilli sert de témoin.

TEMPS DE SÉJOUR à 20°.	POIDS des précipit ^s .	QUANTITÉ d'albumine digérée.
Témoin	224 milligr.	»
1 minute	204 milligr.	120 milligr.
5 minutes	206 milligr.	118 milligr.
15 minutes	203 milligr.	121 milligr.
30 minutes	205 milligr.	119 milligr.
4 heures	182 milligr.	142 milligr.

Pour nous trouver dans des conditions comparables à celles où nous nous étions placé avec les solutions de papaïne, il était nécessaire de neutraliser le jus d'ananas, ou de s'adresser au ferment précipité par l'une des méthodes de Chittenden (1) ou par l'alcool. Nous nous sommes borné à opérer avec le jus naturel simplement neutralisé : nous n'avons pas retrouvé, avec l'intensité si considérable que nous lui connaissons pour la papaïne, l'atténuation du ferment en présence de l'ovalbumine ou du sérum. Dans quelques expériences cependant, les chiffres obtenus paraissent indiquer l'existence du phénomène. L'emploi du ferment précipité, de composition moins complexe, nous eût probablement fourni des résultats plus significatifs. Nous n'avons pas cru devoir poursuivre ici cette étude. Nous nous bornons à donner à titre d'indication les résultats de l'une des expériences auxquelles nous venons de faire allusion.

EXP. XXVII. — On neutralise soigneusement au moyen d'une solution de carbonate de soude du jus d'ananas fraîchement obtenu ; puis on fait

(1) Le ferment précipité présente pour l'expérience certains avantages parce qu'il n'introduit pas la masse considérable de matières étrangères (sucres, mucilages), contenus dans le jus, et parce que sous un poids très faible il est très actif (beaucoup moins toutefois comme on peut s'y attendre que la masse liquide d'où on l'a extrait).

La précipitation par l'alcool exige de grandes quantités de ce produit, et il est nécessaire pour précipiter le ferment en totalité d'arriver à un titre alcoolique très élevé.

une série de mélanges contenant 10 c. c. de sérum de cheval dilué de moitié et 4 c. c. de jus neutralisé. Ces mélanges sont abandonnés à la température du laboratoire (20°) pendant des temps variables ; ils sont ensuite portés à la température d'ébullition après avoir été additionnés de 2 gouttes d'acide acétique. Le tableau ci-dessous indique le poids des précipités obtenus :

TEMPS DE SÉJOUR à 20°	POIDS des précipités.	QUANTITÉ d'albumine digérée
Témoin	324 milligr.	
3 minutes	214 milligr.	110 milligr.
30 minutes	227 milligr.	97 milligr.
1 heure	233 milligr.	91 milligr.
2 heures	239 milligr.	85 milligr.
4 heures	242 milligr.	82 milligr.

Il n'y a pas lieu d'insister autrement sur les causes de la digestion brusque par la broméline dont nous venons d'esquisser l'étude. Nous avons suffisamment développé, à propos de la papaine, comment la résistance à la chaleur de ce ferment était la condition du phénomène. Une résistance semblable de la broméline lui donne la faculté d'agir dans les mêmes conditions. *Le phénomène de digestion brusque commun aux deux ferments rend plus étroit encore le parallélisme qu'on pouvait déjà établir entre leurs propriétés.* Nous pouvons même ajouter que la broméline, comme la papaine, produit la liquéfaction brusque de l'ovalbumine à la température ordinaire.

DEUXIÈME PARTIE

Essais d'immunisation des animaux contre la papaïne.

CHAPITRE IX

LE SÉRUM DES ANIMAUX PRÉPARÉS CONTRE LA PAPAÏNE CONTIENT-IL UN ANTIFERMENT ?

On sait qu'un grand nombre de ferments solubles provoquent, lorsqu'ils sont injectés aux animaux, la formation dans leur sérum de substances antagonistes, les antiferments. L'antiprésure, l'antipepsine, l'antilipase, l'antityrosinase, pour n'en citer que quelques-uns, sont des antiferments qu'il est assez facile d'obtenir et dont on peut mettre aisément l'action en évidence.

Un certain nombre d'expérimentateurs ont tenté d'obtenir par le même procédé une antipapaïne, mais aucun n'a réussi à mettre cette antidiastase en évidence d'une manière indiscutable. Il est vraisemblable que ces insuccès tiennent pour une grande part à la difficulté avec laquelle les animaux de laboratoire supportent les injections répétées de papaïne. Comme nous le verrons plus loin, on ne réussit guère à immuniser contre l'action toxique du ferment et la plupart des animaux succombent lorsqu'on essaie au cours du traitement de dépasser la dose immédiatement mortelle.

Les auteurs qui ont réussi à conserver les animaux en les préparant par des injections répétées de doses relativement faibles ont généralement recherché l'antiferment en faisant agir, en présence du sérum, la papaïne sur la gélatine ou sur la fibrine. Cette méthode, qui est assurément valable lorsqu'on a affaire à des actions empêchantes nettement marquées, doit évidemment être rejetée quand ces actions sont, comme dans le cas qui nous occupe, très faibles ou même douteuses.

Guidé par les résultats des recherches exposées dans la première partie de ce travail nous avons essayé d'utiliser comme matière sensible à l'action du ferment le sérum même de l'animal

préparé. Il est évident, en effet, que si ce sérum est assez riche en antiferment pour neutraliser, par sa présence, l'action protéolytique de la papaïne sur une matière albuminoïde banale, il doit lui-même, par rapport à un sérum d'animal neuf, présenter une résistance considérable à l'action digestive du ferment. Il est vrai que le sérum n'est digéré rapidement par la papaïne qu'à des températures élevées et que précisément à ces températures les antiferments déjà connus sont assez rapidement détruits. Toutefois, une telle destruction étant toujours fonction du temps, il n'était pas évident *a priori* que cette méthode ne permettrait pas de manifester l'action d'une antipapaïne. Nous avons donc commencé par comparer la digestion brusque des sérums neufs de lapins ou de cobayes à la digestion de sérums correspondants provenant d'animaux soumis au préalable à des injections répétées de papaïne.

Exp. XXVIII. — On fait une solution de papaïne à 1 0/0 dans l'eau salée physiologique. Après une demi-heure de macération, à l'étuve à 40°, le liquide est filtré sur papier, puis sur bougie Berkefeld. Chaque centimètre cube de ce liquide représente la macération de 10 mgr de papaïne sèche.

On prépare un lapin en lui injectant à plusieurs reprises dans la veine de l'oreille, 30 mgr de papaïne, c'est-à-dire 3 c. c. de la solution à 1 0/0.

Les injections sont faites le 29 novembre, le 5 décembre, le 13 décembre et le 22 décembre 1907. Le lapin est saigné à blanc le 6 janvier 1908.

Le sang est recueilli stérilement et le sérum exsudé, séparé du caillot après 24 heures.

On essaye le pouvoir digestif de la papaïne sur ce sérum de lapin préparé, en le comparant à du sérum de lapin neuf obtenu dans les mêmes conditions que le précédent.

On fait avec chacun des sérums deux mélanges a) et b) constitués par 10 c. c. de sérum de lapin dilué de moitié avec de l'eau physiologique et 5 c. c. de papaïne à 2 0/0.

Les mélanges a) sont traités directement par un volume égal d'acide trichloracétique à 10 0/0, puis chauffés à l'ébullition. Les précipités sont recueillis sur des filtres tarés et pesés après dessiccation.

Ces échantillons dans lesquels l'action digestive n'a pas pu se produire en milieu trichloracétique serviront de témoins.

Les mélanges b) sont portés au bain-marie à 90° pendant 5 minutes, ensuite précipités par l'acide trichloracétique, et ensuite traités comme les précédents.

Les pesées des précipités donnent les chiffres suivants :

	SÉRUM NORMAL	SÉRUM PRÉPARÉ
Témoins <i>a)</i>	,380 milligr.	340 milligr.
Mélanges <i>b)</i>	60 milligr.	52 milligr.

Exp. XXIX. — Un cobaye reçoit sous la peau 30 mgr de papaine à trois reprises différentes : le 4 novembre, le 13 novembre et le 29 novembre. Il est saigné à blanc le 5 décembre 1907. Son sérum est comparé à celui d'un cobaye neuf, au point de vue de sa digestibilité à haute température, par la papaine.

On fait avec chacun des sérums deux mélanges *a)* et *b)* constitués par 4 c. c. de sérum de cobaye étendu de 4 c. c. d'eau physiologique et 4 c. c. de papaine à 2 0/0.

Les mélanges *a)* sont traités directement par un volume égal d'acide trichloracétique à 10 0/0.

Les mélanges *b)* sont portés 5 minutes dans un bain de 90°, puis le contenu est traité par l'acide trichloracétique. Les précipités desséchés et pesés donnent les chiffres suivants :

	SÉRUM NORMAL	SÉRUM PRÉPARÉ
Témoins <i>a)</i>	236 milligr.	257 milligr.
Mélanges <i>b)</i>	140 milligr.	154 milligr.

Ces deux expériences montrent que les sérums de lapins ou de cobayes préparés contre la papaine sont, dans la méthode du chauffage brusque, digérés sensiblement de la même façon que les sérums neufs correspondants. Positifs, les résultats de ces expériences eussent été d'une certaine valeur au point de vue de la réponse à donner à la question que nous nous sommes posée; négatifs, ils ne peuvent évidemment, pour les raisons déjà indiquées, nous autoriser à en tirer une conclusion.

Nous avons alors essayé de trancher la question en nous basant sur ce fait déjà signalé que le sérum de lapin présente la particularité d'être assez facilement attaqué par la papaine à l'étuve

à 40°. Nous pouvions d'ailleurs du même coup rechercher si les propriétés destructrices du sérum normal vis-à-vis de la papaïne sont pas exagérées par la préparation des animaux. Il nous suffisait pour cela de porter à l'étuve, en même temps que le mélange qui devait servir à apprécier l'intensité de la digestion à 40°, un mélange identique que l'on pouvait soumettre à un chauffage brusque après un temps de contact plus ou moins prolongé.

C'est ce que nous avons tenté de réaliser dans l'expérience suivante :

EXP. XXX. — Même lapin que dans l'expérience XXVIII. Son sérum est comparé au point de vue de sa digestibilité par la papaïne à 40° avec du sérum de lapin neuf.

On fait, tant pour le sérum du lapin neuf que pour celui du sérum du lapin préparé, trois mélanges *a*), *b*), *c*), constitués par 10 c. c. de sérum dilué de moitié, auxquels on ajoute 5 c. c. de papaïne à 2 0/0.

Le flacon *a*) traité directement par un volume égal d'acide trichloracétique à 10 0/0, puis chauffé à l'ébullition, sert de témoin.

Le flacon *b*) est maintenu pendant 1 heure 40 minutes à la température de 40°. Il est ensuite additionné d'un volume égal d'acide trichloracétique, puis bouilli.

Le poids du précipité sec mesurera la quantité de sérum préparé qui a échappé à la digestion.

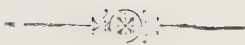
Le flacon *c*) est laissé d'abord pendant 1 heure 40 minutes à 40°, porté ensuite 5 minutes au bain-marie à 90°, puis finalement additionné de son volume d'acide trichloracétique et porté à l'ébullition.

Le poids du précipité sec indiquera l'intensité de la digestion brusque du sérum préparé, par une solution de papaïne qui aura subi pendant près de deux heures le contact à 40° du sérum dans lequel on cherche une action antipapaïnique. Ces trois échantillons sont comparés aux échantillons faits dans les mêmes conditions avec du sérum de lapin neuf.

	SÉRUM normal.	SÉRUM préparé.
Témoins <i>a</i>).....	380 milligr.	340 milligr.
Mélanges <i>b</i>).....	233 milligr.	214 milligr.
Mélanges <i>c</i>).....	70 milligr.	62 milligr.

Si on examine les chiffres du tableau ci-dessus, on voit qu'à 40°, pendant 1 heure 40 minutes, le sérum préparé se digère aussi bien que le sérum neuf.

On voit, d'autre part, qu'après un contact de 1 heure 40 minutes, le sérum préparé semble exercer sur la papaïne une destruction un peu plus intense que le sérum neuf. Mais la différence est si faible que nous n'osons pas l'attribuer à une action antipapaïnique spécifique du sérum préparé. En fait, pas plus par cette méthode que par celles qui avaient été précédemment employées nous *n'avons réussi à mettre en évidence avec certitude un anti-ferment dans le sérum des animaux soumis à l'immunisation par la papaïne.*



CHAPITRE X

RECHERCHES DES ANTICORPS DANS LE SÉRUM DES ANIMAUX PRÉPARÉS CONTRE LA PAPAÏNE

Du fait que le sérum des animaux préparés contre la papaïne est aussi bien digéré par ce ferment qu'un sérum d'animal neuf, on ne doit pas conclure nécessairement que l'animal injecté n'a pas réagi à la papaïne par la formation des anticorps caractéristiques de l'immunisation.

Nous avons donc recherché si, dans le sang des animaux que nous avons tenté d'immuniser, on ne pouvait déceler certaines substances de réaction de l'organisme contre la papaïne injectée.

On sait que lorsqu'on injecte à un animal des cellules étrangères ou des produits solubles, tels que des toxines, l'animal réagit de diverses façons. Généralement son sérum acquiert la propriété soit de détruire, soit de précipiter *in vitro* les substances injectées.

Ainsi, lorsqu'on injecte des globules rouges de chien à un lapin, après quelques injections, le sérum du lapin acquiert la propriété nouvelle de détruire les globules de chien et seulement les globules de chien.

Lorsqu'on injecte à un lapin du blanc d'œuf de poule, après plusieurs injections le sérum de cet animal acquiert la propriété de précipiter le blanc d'œuf *in vitro*.

On constate ainsi dans le sérum des animaux préparés la présence de substances réagissant d'une façon spécifique sur les substances injectées. Les précipitines ou coagulines, les sensibilisatrices ou lysines constituent les deux grands groupes d'anticorps.

Précipitine. — Nous avons recherché tout d'abord la présence de précipitines dans le sérum de lapin préparé contre la papaïne.

Pour les raisons indiquées précédemment, nos animaux n'ont été injectés qu'avec des doses relativement faibles de ferment. Les solutions de papaïne étaient préparées en suivant la technique exposée dans l'expérience XXVIII.

Exp. XXXI. — Le lapin n° 56 reçoit dans les veines de l'oreille 30 mgr de papaine le 31 janvier 1908, 30 mgr le 8 février, 20 mgr le 19 février et 30 mgr le 2 mars. Il est saigné le 10 mars. Avec son sérum chauffé à 56° pendant une demi-heure on fait les essais suivants en le comparant à du sérum de lapin neuf.

Sérum préparé ...	0 c. c. 3	{	Sérum normal....	0 c. c. 3.
I Papaine 1 p. 1000.	0 c. c. 2		Papaine 1 p. 1000.	0 c. c. 2.
Eau physiologique	0 c. c. 5		Eau physiologique	0 c. c. 5.

Aussitôt le mélange effectué, il apparaît un précipité excessivement abondant dans le tube I, tandis que le tube II reste absolument clair. A la température de 40°, le précipité du tube I augmente légèrement, tandis que le tube II reste absolument clair après 2 heures de séjour à l'étuve.

Il existe donc une précipitine pour la papaine dans le sérum des lapins préparés par des injections de papaine.

L'existence de cette précipitine a été constatée indépendamment de nous chez la chèvre par Stenitzer (1) et chez le lapin par Stanescu (2). Le sérum préparé ajouté à de la papaine chauffée préalablement à 100° n'y produit qu'un précipité inappréciable.

Nous avons cherché les conditions les plus favorables pour manifester l'action de cette précipitine. Laissant invariable la quantité du sérum préparé, nous lui avons ajouté des doses variables de papaine à 1 0/00.

Exp. XXXII. — Le lapin n° 91 reçoit 30 mgr de papaine dans les veines de l'oreille le 5 décembre, le 13 décembre, le 22 décembre 1907, le 6 janvier 1908. Il est saigné le 22 janvier 1908. On chauffe son sérum à 56°. On fait les mélanges suivants :

Sérum préparé	0 c. c. 3	+	Papaine à 1 pour 1,000	0 c. c.
—	—	+	—	0 c. c. 1
—	—	+	—	0 c. c. 2
—	—	+	—	0 c. c. 3
—	—	+	—	0 c. c. 4
—	—	+	—	0 c. c. 5
—	—	+	—	0 c. c. 6
—	—	+	—	0 c. c. 7
—	—	+	—	0 c. c. 8
—	—	+	—	0 c. c. 9
—	—	+	—	1 c. c.
—	—	+	—	1 c. c. 1
—	—	+	—	1 c. c. 2

(1) STENITZER, *Biochem. Zeitschr.*, 7 avril 1908.

(2) STANESCU, *Thèse de Bucarest.* 1908.

On ramène tous les tubes avec de l'eau physiologique à un volume égal (1 c. c. 5). On porte à l'étuve à 40°, on observe le précipité après une demi-heure. Dans le 1^{er} tube il n'y a pas trace de précipité. Dans les 2^e et 3^e, il y a un précipité très abondant. Il est maximum dans le tube contenant 0 c. c. 2 de papaïne. Dans le tube renfermant 0 c. c. 3 le précipité commence à décroître. Il diminue jusqu'à 4 c. c. 1. A 4 c. c. 2 il est complètement nul.

On voit que la formation du précipité est fonction de la quantité de ferment ajouté. L'action précipitante du sérum est maxima pour la dose de 0 c. c. 2 de papaïne au 1 0/00 ajouté à 0 c. c. 3 de sérum préparé.

Sensibilisatrice. — Depuis les travaux de Bordet et Gengou il existe une méthode très sensible pour déceler la présence de sensibilisatrices spécifiques dans le sérum des animaux préparés : c'est la méthode dite « de la déviation du complément ».

Pour comprendre facilement la technique de cette méthode il est utile de rappeler en quelques mots les notions essentielles relatives aux sérums hémolytiques. On sait que dans un sérum hémolytique (sérum de lapin, par exemple, préparé contre les globules de chien), l'hémolysine est composée de deux parties : l'une détruite par un chauffage à 56° pendant une demi-heure appelée *alexine* ; l'autre résistant à ce chauffage, à laquelle Bordet a donné le nom de *sensibilisatrice*.

L'alexine existe aussi bien dans le sérum des animaux neufs que dans celui des animaux préparés tandis que la sensibilisatrice ne se forme que pendant l'immunisation.

L'alexine du lapin ne peut se fixer sur les globules de chien *in vitro* pour les détruire ; elle a besoin d'une substance intermédiaire, la sensibilisatrice. Bordet, pour expliquer le mécanisme de l'hémolyse, compare ce phénomène à un phénomène de teinture. La sensibilisatrice serait le mordant indispensable pour fixer l'alexine sur les globules qu'elle doit détruire.

Plus tard, Ehrlich, partant de vues théoriques différentes, donna à l'alexine le nom de *complément* et à la sensibilisatrice celui d'*ambocepteur*. L'anticorps spécifique qui se forme pendant l'immunisation est donc la *sensibilisatrice ou ambocepteur*.

Les sensibilisatrices sont spécifiques, elles sont en aussi grand nombre que les substances injectées ; on a obtenu des sensibilisatrices contre des microbes, contre des éléments cellulaires, contre des matières albuminoïdes, des toxines, etc.

L'alexine, au contraire, peut être considérée comme unique (Bordet).

N'importe quelle sensibilisatrice aura donc la propriété de fixer l'alexine ou complément, pourvu qu'elle soit en présence de l'antigène qui l'a engendrée.

On pourra donc, en prenant des doses convenables de *complément*, d'*anticorps* et d'*antigène*, fixer complètement le complément sur l'anticorps. C'est là le principe de la méthode de la déviation du complément.

Si l'on veut, dans un sérum, mettre en évidence la présence d'un anticorps, il suffira d'ajouter à ce sérum une dose convenable de l'antigène correspondant et une petite quantité de complément. Si le complément disparaît du liquide, il y a présence d'anticorps. Si le complément ne disparaît pas on peut assurer l'absence d'anticorps.

Mais comment vérifier la disparition du complément? D'une façon bien simple. Si au mélange (*complément*, *antigène* et *anticorps*) nous ajoutons un sérum hémolytique quelconque chauffé à 56° (c'est-à-dire privé de son alexine et ne contenant plus que la sensibilisatrice) et des globules lavés correspondant à ce sérum hémolytique, l'hémolyse se produira si dans ce premier mélange il reste du complément; elle ne se produira pas si dans ce même mélange il n'existe plus de complément.

Par la présence ou l'absence de l'hémolyse on pourra ainsi vérifier la présence ou l'absence du complément.

L'absence de complément prouvera la présence d'anticorps; la présence de complément prouvera l'absence d'anticorps.

On voit que dans ce cas on emploie le sérum hémolytique et les globules uniquement comme un réactif coloré.

La méthode de la déviation du complément n'avait pas été employée pour rechercher dans le sérum des animaux la présence d'une sensibilisatrice quand on leur avait injecté des ferments solubles.

Pour faire cette recherche nous avons employé les mélanges suivants :

- | | |
|-------------|---|
| | { Antigène.... Papaine à 1 p. 1000. |
| Mélange I. | { Anticorps ... Sérum de lapin préparé contre la papaine. |
| | { Complément. Sérum de cobaye neuf. |
| | { Globules de bœuf, lavés. |
| Mélange II. | { Sérum de lapin hémolytique pour le bœuf et chauffé à 56°. |

Si le lapin a réagi contre la papaine, son sérum contient un anticorps qui, se fixant sur l'antigène, dévie pour son compte le complément.

En introduisant alors dans le mélange I le mélange II il ne doit pas y avoir d'hémolyse, puisque le complément a été dévié.

Si, au contraire, le lapin n'a pas réagi, son sérum ne contient pas d'anticorps spécifique; celui-ci donc a une action nulle sur l'antigène et, par suite, le complément reste libre dans le mélange I. Si à ce moment on introduit le mélange II dans le mélange I, l'ambocepteur hémolytique trouve un complément disponible et l'hémolyse doit se produire rapidement.

Cette méthode, en théorie assez simple, devient assez compliquée dans le cas présent. En effet, pour que l'anticorps du sérum préparé puisse dévier le complément, en présence de l'antigène, il faut employer une dose convenable d'anticorps. Mais la papaine a un pouvoir empêchant très manifeste pour les phénomènes hémolytiques. Il faut donc employer une dose de papaine suffisante pour obtenir la déviation du complément, sans qu'elle soit cependant assez forte pour empêcher le processus hémolytique. Il a donc fallu doser les quantités relatives de papaine et de sérum préparé à employer.

La dose de complément a aussi son importance et l'on ne doit pas oublier que le complément perd progressivement une grande partie de son activité dans les premiers jours qui suivent la saignée.

Dix jours après la saignée, il commence à être stable; aussi est-il indiqué de n'employer, comme complément, que du sérum de cobaye datant de 10 jours environ et conservé à la glacière.

Il faut de plus, comme on le verra plus loin, faire de nombreux témoins, pour ne pas s'exposer à rapporter au sérum préparé une déviation de complément qui serait tout simplement due à une dose trop forte de papaine ou d'une autre substance empêchant l'hémolyse.

L'expérience suivante est un type auquel nous sommes arrivés après de très longs tâtonnements.

EXP. XXXIII. — On emploie le sérum du lapin n° 42 qui a reçu 30 mgr de papaine dans la veine de l'oreille, le 31 janvier 1907, le 19 février, le 2 mars, puis 60 mgr le 16 mars, le 2 avril et le 7 mai 1908. Il a été saigné le 14 mai.

On chauffe ce sérum à 56° pendant une demi-heure, pour le débarrasser du complément.

Le sérum du lapin témoin est du sérum de lapin neuf chauffé à 56° pendant une demi-heure.

La solution de papaïne employée est faite au millième dans l'eau physiologique.

On fait les mélanges suivants :

I.	} Papaïne..... 0,5 Sérum préparé. 0,3 Complément.... 0,1	II.	} Eau physiol.... 0,5 Sérum préparé. 0,3 Complément.... 0,1	III.	} Papaïne..... 0,5 Eau physiol.... 0,3 Complément.... 0,1
IV.	} Papaïne..... 0,5 Sérum normal.. 0,3 Complément.... 0,1	V.	} Eau physiol.... 0,5 Sérum normal.. 0,3 Complément.... 0,1	VI.	} Eau physiol.... 0,5 Complément.... 0,1

Après agitation, on porte ces tubes à la température de 37° pendant 1 heure.

On ajoute alors à tous les tubes du sérum de lapin préparé contre les globules de bœuf et chauffé à 56° une demi-heure, ainsi que des globules de bœuf centrifugés et lavés plusieurs fois, puis émulsionnés dans vingt fois leur volume d'eau physiologique.

Sérum lapin-bœuf..... 0 c. c. 1

Globules de bœuf au 1/20..... 1 c. c.

On porte à l'étuve à 37°. On note les tubes qui hémolysent. Après 30 minutes on a les résultats suivants :

I.	—	Hémolyse.....	Nulle.
II.	—		Complète.
III.	—		Complète.
IV.	—		Presque complète.
V.	—		Presque complète.
VI.	—		Complète.

Après une heure :

I.	—	Hémolyse.....	Nulle.
II.	—		} Complète.
III.	—		
IV.	—		
V.	—		
VI.	—		}

Après 2 heures le tube I ne montre pas trace d'hémolyse.

Il est donc évident que le sérum de lapin préparé contre la papaïne dévie le complément en présence de la papaïne. Le lapin a donc produit vis-à-vis de la papaïne un anticorps ayant les caractères d'une sensibilisatrice.

La faculté que possède le sérum de lapin préparé contre la papaïne de précipiter les solutions de ce ferment, ainsi que celle de dévier le complément en présence de papaïne, est tout à fait spécifique.

En effet, on ne peut mettre en évidence la présence ni de la

précipitine, ni de l'anticorps déviant le complément quand on met le sérum préparé en présence de pancréatine ou de broméline.

En résumé : *Le sérum des lapins préparés contre la papaine contient une précipitine spécifique et un anticorps spécifique déviant le complément en présence de la papaine.*

Il est vraisemblable que ces anticorps agissent plutôt sur la matière albuminoïde très complexe du suc de papayer que sur le ferment digestif lui-même, puisque ce ferment ne paraît pas modifié davantage par le sérum préparé que par le sérum normal.

Nous ajouterons que nous n'avons pas réussi à mettre en évidence dans le sérum des cobayes préparés la présence des anticorps que nous avons observés chez le lapin, mais, comme nous allons le montrer, on se heurte, lorsqu'on veut tenter d'immuniser le cobaye, à des difficultés presque insurmontables.



CHAPITRE XI

RÉACTIONS GÉNÉRALES DES ANIMAUX PRÉPARÉS.

ANAPHYLAXIE DU COBAYE A LA PAPAÏNE.

a) *Lapins*. — Dans tous nos essais d'immunisation le sérum de ces animaux contenait une précipitine et un anticorps déviant le complément.

Cependant, nous ne sommes jamais arrivés à immuniser réellement le lapin contre l'action toxique générale ou locale de la papaïne.

En dosant bien la quantité de ferment injecté, on arrive à faire vivre les animaux très longtemps sans qu'ils perdent de leur poids; mais chaque fois qu'on leur injecte une dose de papaïne mortelle pour un lapin neuf, l'expérience se termine toujours par la mort du lapin en immunisation.

b) *Cobayes*. — Avec ces animaux nous avons eu un résultat beaucoup plus intéressant.

Les cobayes, injectés de très petites doses de papaïne, ne tardent pas à succomber après quelques injections, en n'ayant reçu en tout qu'une dose de papaïne de beaucoup inférieure à la dose mortelle.

Les injections répétées de petites doses de papaïne, loin d'immuniser les cobayes, les rendent donc plus sensibles à ce poison. Ils présentent les phénomènes d'*hypersensibilité* ou d'*anaphylaxie* décrits pour la première fois par Richet en 1902. On sait que cet auteur isola, des actinies, un poison auquel il donna le nom de *congestine* à cause des phénomènes congestifs qu'il produit lorsqu'on l'injecte à des chiens. Cette congestine injectée à très petites doses ne produit chez le chien que des troubles passagers et l'animal ne tarde pas à se remettre. Mais si l'on injecte quelques jours plus tard une dose vingt fois plus faible de poison, l'animal meurt avec tous les symptômes de l'empoisonnement par l'actinocongestine.

La première injection a donc produit chez le chien un phénomène inverse de l'immunité : elle l'a *hypersensibilisé*, elle l'a

anaphylactisé. Plus tard, Arthus décrivit les phénomènes d'anaphylaxie vis-à-vis du sérum de cheval, quand on l'injecte à petites doses à des lapins. Behring et Knorr avaient déjà obtenu d'ailleurs des phénomènes analogues en injectant à des cobayes ou à des chevaux de petites doses de toxine tétanique. Nous avons, à notre tour, reconnu l'existence de phénomènes d'anaphylaxie à la suite d'injections de papaïne à des cobayes. L'hypersensibilité des cobayes à la papaïne explique la mortalité énorme à laquelle on se heurte quand on tente d'immuniser les cobayes contre ce ferment.

Dès qu'on injecte à ces animaux des doses un peu fortes de papaïne, ils font, dès le lendemain ou le surlendemain de l'injection, de vastes escarres humides de la paroi, au niveau de l'injection, puis ils ne tardent pas à mourir.

Dans nos expériences nous avons tout d'abord déterminé la dose mortelle de papaïne pour des cobayes de taille moyenne. Une dose de 50 mgr injectée sous la peau les fait mourir dans les douze heures qui suivent l'injection.

A l'autopsie, les animaux présentent une congestion intense de tous les organes abdominaux, ainsi que de nombreux foyers hémorrhagiques sous-muqueux sur toute la longueur du tube digestif.

Une dose de 30 mgr peut être tolérée et souvent même répétée trois fois à quinze jours d'intervalle.

Les animaux ne meurent qu'après la troisième injection en présentant toujours des phénomènes de congestion intense de tous les organes abdominaux.

Lorsqu'on injecte, sous la peau des cobayes, de petites doses de papaïne, à des intervalles de 4 à 5 jours, le tableau est tout à fait différent.

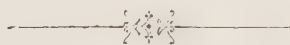
Les quelques chiffres qui suivent montrent suffisamment le phénomène qui se produit.

COBAYES Nos	DOSES DE PAPAÏNE INJECTÉE					
	milligr.	milligr.	milligr.	milligr.	milligr.	
50	4	4	4	4	6	Mort 3 jours après la dernière inject.
24	4	4	4	4	6	Mort 11 jours après la dernière inject.
85	4	4	4	6	»	Mort 3 jours après la dernière inject.
62	4	4	4	6	»	Mort 5 jours après la dernière inject.
94	4	4	4	»	»	Mort 3 jours après la dernière inject.
87	4	4	»	»	»	Mort 2 jours après la dernière inject.
87	4	4	»	»	»	Mort 10 jours après la dernière inject.

On voit que dans tous les cas les cobayes sont nettement anaphylactisés. En effet, ils meurent tous après l'injection d'une dose de papaïne de beaucoup inférieure à la dose mortelle.

Il ne peut être question d'accumulation du poison dans l'organisme, attendu que chez tous les cobayes sans exception la quantité totale de papaïne injectée est inférieure à 30^{mgr} dose qui, en injection massive, est facilement supportée par les cobayes neufs.

En résumé : *Les injections répétées de petites doses de papaïne provoquent chez le cobaye un état d'anaphylaxie non douteux. La mort survient alors rapidement, accompagnée de phénomènes congestifs très intenses de tous les organes abdominaux.*



CONCLUSIONS

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que la papaine peut, dans certaines conditions, digérer les matières albuminoïdes avec une vitesse extrêmement considérable : il suffit de porter à l'ébullition un mélange d'ovalbumine ou de sérum naturels et d'une quantité convenable de ferment pour que la plus grande partie des albuminoïdes soit transformée en albumoses et en peptone.

Nous avons étudié en détail ce phénomène. Son caractère essentiel est de ne se produire qu'à haute température et dans le court espace de temps où le mélange franchit l'intervalle compris entre 80° et 95°. Il doit être rapporté à l'activité particulière de la papaine aux températures élevées, qui lui permet d'attaquer la matière albuminoïde au moment même de la dénaturation.

Nous avons observé qu'aux températures ordinaires, la papaine subit en présence de l'ovalbumine et du sérum naturels une atténuation progressive qui explique certains résultats paradoxaux de nos premières expériences.

Les tissus animaux, pris à l'état naturel, et les matières albuminoïdes végétales, associées à la papaine, peuvent subir également, sous l'influence de ce ferment, la digestion brusque, à haute température.

Aux températures ordinaires, l'albumine d'œuf, sans être digérée par la papaine, perd instantanément, à son contact, sa viscosité naturelle.

Enfin, dans une étude très succincte, nous avons pu étendre à la broméline, ferment soluble très voisin de la papaine, les résultats que nous avons observés avec cette diastase.

Dans la seconde partie, nous avons montré, tout d'abord, que le sérum des animaux préparés contre la papaine, est tout aussi attaquant par le ferment que le sérum des animaux neufs et nous en avons déduit qu'il ne se forme vraisemblablement pas d'antiferment au cours de la préparation.

Nous avons observé toutefois que le sérum des lapins préparés acquiert de nouvelles propriétés : ce sérum possède une précipitine spécifique et un anticorps (sensibilisatrice) capable de dévier le complément.

Nous avons montré enfin que le cobaye présente, à la suite d'injections répétées de très petites doses de papaïne, un état d'anaphylaxie tout à fait caractéristique. ¶

(Travail du laboratoire de physiologie de l'Institut Pasteur.)



TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	5

PREMIERE PARTIE

Etude d'un phénomène de digestion brusque par la papaïne.

CHAPITRE I. — Premiers essais de digestion de l'ovalbumine et du sérum naturels par la papaïne. — Leurs résultats.....	10
CHAPITRE II. — Absence du phénomène de digestion brusque aux températures ordinaires.....	21
CHAPITRE III. — Conditions et limites de température où se produit la digestion brusque. — Essai d'interprétation.....	28
CHAPITRE IV. — Influence de la réaction de milieu. — Etude des produits de transformation.....	40
CHAPITRE V. — Action du sérum et de l'ovalbumine naturels sur la papaïne.....	48
CHAPITRE VI. — Liquéfaction de l'ovalbumine par la papaïne aux températures ordinaires.....	53
CHAPITRE VII. — Digestion des tissus par la papaïne à haute température.....	57
CHAPITRE VIII. — Digestion brusque produite par la broméline. — Comparaison avec la papaïne.....	61

DEUXIÈME PARTIE

Essais d'immunisation des animaux.

CHAPITRE IX. — Le sérum des animaux préparés contre la papaïne contient-il un antiferment ?.....	67
CHAPITRE X. — Recherche des anticorps dans le sérum des animaux préparés contre la papaïne.....	72
CHAPITRE XI. — Réactions générales des animaux préparés. — Anaphylaxie du cobaye à la papaïne.....	79
CONCLUSIONS.....	82

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

GÉOLOGIE. — Le surcreusement glaciaire.

BOTANIQUE. — Réserves albuminoïdes des végétaux.

VU ET APPROUVÉ

Paris, le 27 octobre 1908.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

PAUL APPELL.

VU

ET PERMIS D'IMPRIMER,

Paris, le 27 octobre 1908.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD

